

**MODIFIZIERUNG UND PROZESSIERUNG DES REKOMBINANTEN  
SPINNENSEIDENPROTEINS eADF4(C16) ZUR STEUERUNG DER  
INTERAKTION ZWISCHEN ZELLEN UND SEIDENFILMEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

**DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN**

an der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik  
und Naturwissenschaften der Universität Bayreuth

Vorgelegt von

DIPLOM-CHEMIKERIN

**STEFANIE WOHLRAB**

Bayreuth 2014



Die vorliegende Arbeit wurde von September 2010 bis Mai 2014 am Lehrstuhl Biomaterialien, Fakultät für Ingenieurwissenschaften, Universität Bayreuth, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Scheibel angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.).

Dissertation eingereicht am: 19.05.2014

Zulassung durch das Leitungsgremium: 04.06.2014

Wissenschaftliches Kolloquium: 16.01.2015

Amtierender Direktor der BayNAT: Prof. Dr. Franz X. Schmid

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Thomas Scheibel	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Andreas Fery	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Ruth Freitag	(Vorsitz)
Prof. Dr. Markus Retsch	

(Drittgutachter: Prof. Dr. Jürgen Groll)





# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>4</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 SEIDEN .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 SPINNENSEIDE .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 ÜBERBLICK ÜBER VERSCHIEDENE SEIDENARTEN VON RADNETZSPINNEN .....	7
1.2.2 STRUKTUR UND AUFBAU DER DRAGLINE-SEIDE .....	8
<b>1.3 REKOMBINANTE SPINNENSEIDENPROTEINE .....</b>	<b>11</b>
1.3.1 HERSTELLUNG .....	12
1.3.2 REKOMBINANTE SPINNENSEIDENPROTEINE ALS BIOMATERIAL .....	14
1.3.2.1 ASSEMBLIERUNG IN VERSCHIEDENE MORPHOLOGIEN .....	15
1.3.2.1.1 Selbstorganisation von Blockcopolymeren .....	15
1.3.2.1.2 Herstellung verschiedener eADF4(C16) Morphologien .....	16
1.3.2.1.3 eADF4(C16) Filme .....	18
1.3.2.1.3 Vliese aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen .....	20
1.3.2.2 FUNKTIONALISIERUNG VON SEIDENPROTEINEN .....	21
1.3.2.2.1 Genetische Modifikation .....	21
1.3.2.2.2 Chemische Modifikation .....	22
<b>1.4 FLORFLIEGENSEIDE .....</b>	<b>25</b>

<b>1.5 INTERAKTIONEN ZWISCHEN BIOMATERIALIEN UND ZELLEN .....</b>	<b>27</b>
1.5.1 STEUERUNG DER ZELLADHÄSION DURCH SPEZIFISCHE MOTIVE.....	27
1.5.1.1 INTEGRINE.....	27
1.5.1.1.1 Struktur und natürliche Liganden von Integrinen.....	28
1.5.1.1.2 Zelladhäsion .....	31
1.5.1.1.3 Die RGD-Sequenz .....	32
1.5.2 STEUERUNG DER ZELLADHÄSION DURCH UNSPEZIFISCHE INTERAKTIONEN.....	35
1.5.2.1 PROTEIN-BIOMATERIAL WECHSELWIRKUNGEN .....	35
1.5.2.2 OPTIMIERTE OBERFLÄCHENTOPOGRAPHIE .....	35
<b>2 ZIELSETZUNG.....</b>	<b>38</b>
<b>3 SYNOPSIS .....</b>	<b>40</b>
3.1 RGD-MODIFIZIERTE SPINNENSEIDENFILME .....	42
3.2 ZELLADHÄSION UND AUSRICHTUNG AUF STRUKTURIERTEN SEIDENFILMEN.....	44
3.3 BENETZBARKEIT VON SPINNENSEIDENFILMEN .....	47
<b>4 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>52</b>
<b>5 DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS .....</b>	<b>72</b>
<b>6 PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>74</b>
<b>7 TEILARBEITEN.....</b>	<b>76</b>
7.1 TEILARBEIT I.....	76

<b>7.2 TEILARBEIT II.....</b>	<b>88</b>
<b>7.3 TEILARBEIT III.....</b>	<b>97</b>
<b>7.4 TEILARBEIT IV.....</b>	<b>105</b>
<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>138</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Natürliche Spinnenseide wurde über Millionen Jahre durch Evolution effektiv für ihre Funktion optimiert und weist eine Zähigkeit auf, welche derzeit von keinem anderen natürlichen oder synthetischen Material erreicht werden kann. Zusätzlich ist Spinnenseide schon seit Jahrhunderten für ihre gute Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit bekannt und wurde deshalb schon in der Antike von Menschen als Wundauflage erfolgreich eingesetzt. Auch heutzutage ist durch die rekombinante Produktion von Spinnenseidenproteinen ein Einsatz als vielfältiges Biomaterial möglich. Durch Prozessierung in unterschiedliche Morphologien, sind neben der Verwendung als Hochleistungsfaser auch biomedizinische Applikationen wie gezielter Wirkstofftransport, Implantatbeschichtungen oder Wundauflagen realisierbar.

In der vorliegenden Dissertation wurde mit Filmen aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) und Varianten davon gearbeitet. Die Proteine basieren dabei auf der Konsensussequenz der repetitiven Kerndomäne des *Dragline*-Seidenproteins ADF4 (*A. diadematus* Fibroin 4) der europäischen Gartenkreuzspinne (*A. diadematus*) und können biotechnologisch effizient hergestellt werden.

Aufgrund der geringen Interaktion zwischen Zellen und nicht modifizierten glatten Seidenfilmen, ist eADF4(C16) als Beschichtung für Katheder, Stents oder Silikonbrustimplantate, bei denen Zelladhäsion nicht erwünscht ist, gut geeignet. Im Hinblick auf andere Einsatzbereiche (z.B. Geweberegeneration) ist eine ausreichende Wechselwirkung zwischen Material und Zellen der umgebenden Matrix für den Erfolg des Implantats essentiell. Da Zelladhäsion generell durch unspezifische Interaktionen (z.B. Topographie, Benetzbarkeit oder Ladung) aber auch durch spezifische Motive vermittelt werden kann, wurde als erstes ein minimales Erkennungsmotiv für Integrine (RGD) an das Seidenprotein gekoppelt. Zum einem wurde mittels molekularbiologischer Methoden eine lineare RGD Sequenz (GRGDSPG) in eADF4(C16) eingeführt, zum anderen konnte eine Cystein beinhaltende Variante (ntag<sup>Cys</sup>C16) erfolgreich mit einem cyclischen RGD Peptid (c(RGDfK)) chemisch modifiziert werden. Dabei zeigten im Vergleich zu eADF4(C16) Filmen, auf RGD funktionalisierten Seidenfilmen kultivierte BALB/3T3 Fibroblasten eine signifikant

bessere Adhäsion und schnellere Proliferation. Die Zellbindungsaktivität der linearen RGD-Sequenz (genetisch modifiziert) war dabei nicht von der des Cyclopeptids (chemisch gekoppelt) zu unterscheiden.

Einer der Gründe für die verminderte Fibroblasten Adhäsion auf eADF4(C16) Filmen ist die geringe Rauigkeit der Filmoberfläche und die damit verbundene Verhinderung von physikalischen Verankerungen der Zellen. Deshalb wurde im zweiten Teil der Dissertation durch Änderung der physikochemischen Eigenschaften von Seidenfilmen Einfluss auf die unspezifischen Interaktionen zwischen Zellen und Material genommen. Zur Einführung einer Oberflächentopographie wurden mittels Mikroabformung in Kapillaren (*micro-molding in capillaries*, MIMC) strukturierte Seidenfilme mit parallelen Rillen hergestellt. Im Vergleich zu glatten eADF4(C16) Filmen konnte die Zelladhäsion auf den so hergestellten Filmen signifikant erhöht werden. Durch die vorhandene Fernordnung im Mikrometerbereich konnte gleichzeitig auch die Ausrichtung der Zellen entlang des aufgetragenen Musters gesteuert werden. Um die Stabilität der Seidenfilme zu erhöhen, wurde zusätzlich zu den negativ geladenen Spinnenseidenproteinen das positiv geladene rekombinante Fliege Eierspinn-Seidenprotein N[AS]<sub>8</sub>C herangezogen. Die beiden Proteintypen bildeten dabei die ideale Kombination, um mechanisch stabile strukturierte Seidenfilme herzustellen. Aufgrund der geringen Zelladhäsion auf N[AS]<sub>8</sub>C Oberflächen konnte darüber hinaus die Adhäsion und Proliferation von BALB/3T3 Fibroblasten und C2C12 Myoblasten auf die Spinnenseidenoberflächen begrenzt werden, wodurch sich die Zellen parallel zu der Rillenachse ausrichteten.

Neben der Einführung einer Oberflächenstruktur in Seidenfilmen, konnte auch gezeigt werden, dass die Benetzbarkeit von eADF4(C16) Filmen individuell eingestellt werden kann. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften der hier verwendeten rekombinanten Spinnenseidenproteine konnte durch Änderung spezifischer Grenzflächen (Protein-Substratoberfläche) die Benetzbarkeit von eADF4(C16) Filmen beeinflusst werden. Auf den ausgewählten hydrophoben und hydrophilen Modelloberflächen (Polytetrafluorethylen, Polystyrol und Glas) konnte so der Wasserkontaktwinkel der Seidenfilmoberflächen, je nach verwendetem Substrat, im Bereich von 39-113° eingestellt werden, wobei jeweils eine Umkehr der Substrat-Hydrophobizität zu beobachten war. Des Weiteren wurde basierend auf den vorliegenden Erkenntnissen und in Anlehnung an die Mikrophasenseparation von

Blockcopolymeren ein Modell zur Selbstassemblierung von eADF4(C16) auf Substraten unterschiedlicher Hydrophobizität vorgeschlagen.

Insgesamt wurden unterschiedliche Möglichkeiten zur Steuerung der Zelladhäsion auf eADF4(C16) Filmen analysiert. Die Interaktion zwischen Zellen und Seidenoberflächen wurde sowohl durch Einführung spezifischer Signale als auch durch gezielte Steuerung unspezifischer Interaktionen verbessert. Seidenbeschichtungen sind somit durch ihre einstellbaren Eigenschaften, der Biokompatibilität und der Fähigkeit zur Steuerung der Zelladhäsion für diverse biologische und biomedizinische Applikationen ein vielversprechendes Biomaterial.

## SUMMARY

Spider silk has been functionally optimized over millions of years of evolution and it exhibits a toughness that no material, natural or synthetic, can currently match. Additionally, spider silk has been known for centuries for its good biocompatibility and biodegradability and has thus been used since ancient times for wound dressings. Nowadays, recombinant production has made it possible to use spider silk proteins as a versatile biomaterial. By processing into various morphologies, not only can the proteins be used in high performance fibers, but also for biomedical applications such as targeted drug delivery, implant coatings or wound dressings.

This dissertation describes work done with films of the recombinant spider silk protein eADF4(C16) and variants thereof. The proteins, which can be produced efficiently through biotechnology, are based upon the consensus sequence of the repetitive core domain of the dragline silk protein ADF4 (*A. diadematus* Fibroin 4) of the European garden cross spider (*A. diadematus*).

Due to the minimal interactions between cells and smooth unmodified silk films, eADF4(C16) is well suited as a coating for catheters, stents, and silicone breast implants where cell adhesion is not desired. For other applications, for example tissue regeneration, sufficient interactions between implant materials and the cells in the surrounding matrix are essential for the success of the implant. Generally, cell adhesion is promoted through nonspecific interactions (e.g. topography, wettability or charge) but may also occur via specific motifs. Thus, the minimal recognition motif for integrins (RGD) was coupled to the silk protein. One strategy involved molecular biological methods in which a linear RGD sequence (GRGDSPG) was introduced into the eADF4(C16) sequence, while another method employed the chemical coupling of a cyclic RGD peptide (c(RGDfK)) to an cysteine-containing variant (ntag<sup>Cys</sup>C16). In comparison to eADF4(C16) films, RGD functionalized silk films cultivated with BALB/3T3 fibroblasts showed significantly better adhesion and faster proliferation. The cell binding activity of the linear RGD sequence (genetically modified) was no different than that of the cyclopeptide (chemically modified).

One reason for the reduced adhesion of fibroblasts to eADF4(C16) films is the minimal roughness of the films' surface, which hinders the physical anchoring of the cells. Therefore, in the second part of this dissertation, the physiochemical characteristics of the silk films were altered in order to influence nonspecific interactions between cells and materials. Structured silk films with parallel grooves were produced by micromolding in capillaries (MIMIC) in order to introduce surface topography. Cell adhesion to these films was significantly higher in comparison to smooth eADF4(C16) films. The long range micrometer structure also enabled alignment of the cells along the pattern. To increase the stability of the silk films, the negatively charged spider silk protein was used in combination with a positively charged recombinant lacewing egg stalk protein, N[AS]<sub>8</sub>C. These two protein types were an ideal combination for producing mechanically stable structured silk films. Due to minimal cell adhesion to N[AS]<sub>8</sub>C surfaces, the adhesion and proliferation of BALB/3T3 fibroblasts and C2C12 myoblasts could be confined to the spider silk surface upon which the cells were aligned parallel to the groove axis.

In addition to introducing surface structure to silk films, the wettability of eADF4(C16) films could also be adjusted. Due to the amphiphilic nature of the recombinant proteins used in this study, the wettability of eADF4(C16) films could be influenced by changing the specific interface (protein-substrate surface). The water contact angle of the surface of silk films could be adjusted from 39 to 113° depending upon the hydrophobic and hydrophilic model surfaces (polytetrafluoroethylene, polystyrene and glass) upon which the films were cast, with an inversion of wettability in comparison to the non-coated surface. Based upon these observations, a model similar to microphase separation of block copolymers was proposed for self-assembly of eADF4(C16) on substrates of various hydrophobicities.

In general, various possibilities for controlling cell adhesion on eADF4(C16) films were analyzed. The interactions between cells and silk surfaces were improved by introducing specific signals as well as through targeted controlling of nonspecific interactions. Due to their adjustable properties, their biocompatibility and ability to be adjusted for cell adhesion, silk coatings are thus a promising biomaterial for diverse biological and biomedical applications.



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 SEIDEN

Seiden werden von dem zum Stamm der Gliederfüßer (*Arthropoda*) gehörenden Klassen der Spinnentiere (*Arachnida*), Insekten (*Insecta*) und Tausendfüßer (*Myriapoda*) produziert. Sie bestehen aus Proteinen mit hoch repetitiver Aminosäuresequenz (reich an Alanin, Glycin und Serin), welche in Form von hochkonzentrierten wässrigen Lösungen in speziellen Drüsen vorliegen und durch das Verspinnen einen wasserunlöslichen Faden bilden (Craig 1997). Den faszinierenden mechanischen Eigenschaften der Seide liegt dabei jeweils eine spezifische Kristallinität zu Grunde. Diese wird durch Überstrukturen (z.B. *coiled coils*, *cross-β* oder *parallel-β*) aus einem, je nach Aminosäuresequenz, dominierenden Sekundärstrukturelement hervorgerufen (Lintz und Scheibel 2013).

Seiden von Bienen, Ameisen und Hornissen zeigen eine hohe Elastizität und enthalten Proteine, welche sich zu umeinander windenden  $\alpha$ -helikalen Strängen, sogenannten *coiled coils*, zusammenlagern (Sutherland, Weisman *et al.* 2012). Seiden, in denen  $\beta$ -Faltblätter senkrecht zur Faserachse ausgerichtet vorliegen (*cross-β*), sind relativ selten vorzufinden. Durch deren spezielle Anordnung in der Faser zeigen diese Seidenarten eine hohe Biegesteifheit und Elastizität. Produziert werden diese *cross-β* basierenden Seiden unter anderem von Wasserkäfern, Glühwürmchen, Rüsselkäfern und Florfliegen (Weisman, Okada *et al.* 2009). Der weitaus größere Teil der Seiden ist von  $\beta$ -Faltblättern dominiert, welche entlang der Faserachse ausgerichtet sind. Dieser Seidentyp weist in der Regel eine höhere Zugfestigkeit auf und wird sowohl von Insekten als auch von Spinnentieren produziert. Die  $\beta$ -Faltblätter können dabei entweder parallel, antiparallel oder auch in gemischter Anordnung vorliegen (Craig 1997).

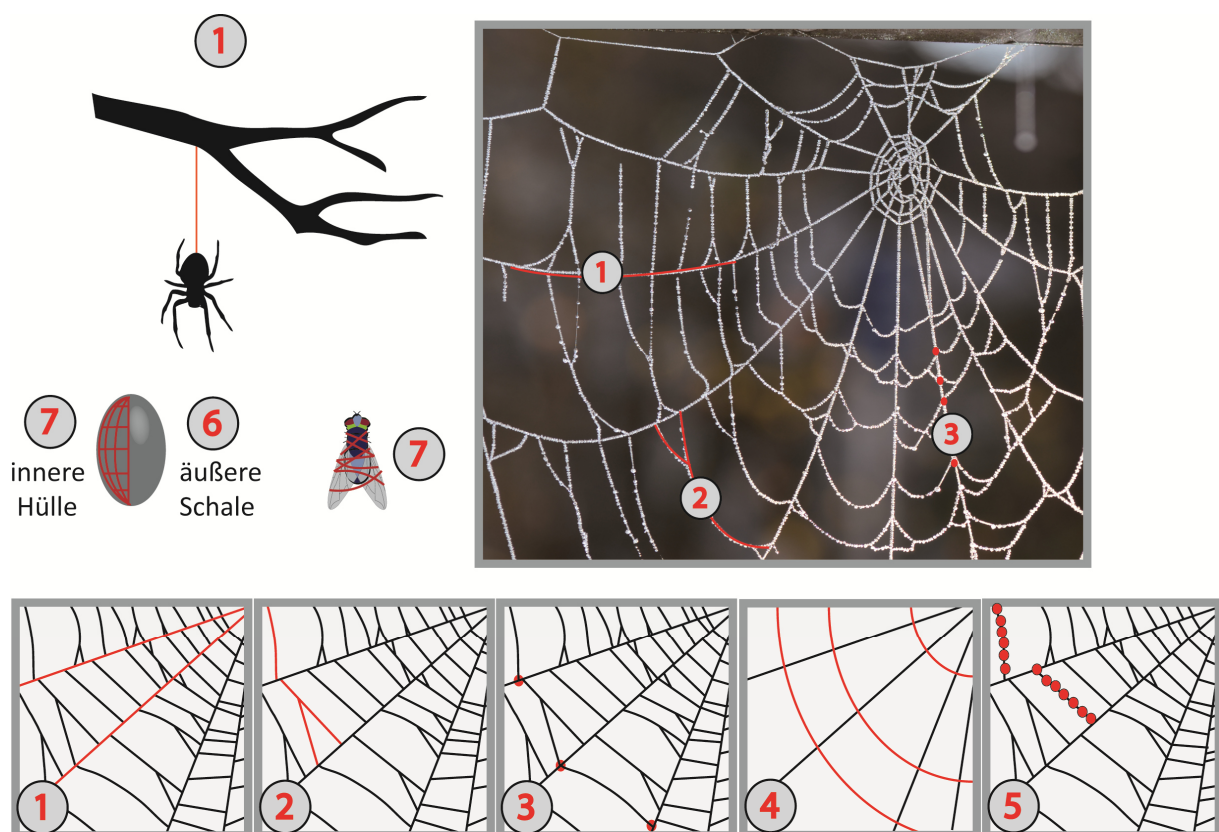
## 1.2 SPINNENSEIDE

Spinnenseide zählt, zusammen mit der Seide des Seidenspinners *Bombyx mori*, zu einer der bekanntesten Seiden. Im Gegensatz zu anderen Gliedertieren, stellen Spinnen für spezifische Aufgaben unterschiedliche Seiden her. Diese setzen sie neben dem Beutefang auch zum Schutz ihrer Nachkommen, als Klebstoff oder zur Flucht vor Feinden ein (Hardy,

Römer *et al.* 2008). Ungefähr die Hälfte aller 44000 bekannten Spinnenarten verwendet für den Beutefang Netze (Platnick 2014). Ferner sind über 130 verschiedene Arten von Netzen bekannt (Römer und Scheibel 2008). Darunter befinden sich unter anderem Trichter-, Baldachin-, Hauben-, Wurf- und Radnetze, alle spezialisiert um unterschiedliche Arten von Beutetieren zu erbeuten (Humenik, Scheibel *et al.* 2011).

### 1.2.1 ÜBERBLICK ÜBER VERSCHIEDENE SEIDENARTEN VON RADNETZSPINNEN

Radnetzspinnen, wie die europäische Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* oder die goldene Seidenspinne *Nevila clavipes* können bis zu sieben verschiedene Seidenarten produzieren (Vollrath und Knight 2001). Diese unterscheiden sich zum Teil stark in ihrer Zusammensetzung sowie in den mechanischen Eigenschaften und sind jeweils nach der Drüse, in der sie gebildet werden, benannt (Guerette, Ginzinger *et al.* 1996). Für den Netzbau verwenden Radnetzspinnen fünf verschiedene Seidentypen (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Darstellung der sieben verschiedenen Seidenarten weiblicher Radnetzspinnen.** (1) Dragline-Seide, (2) Flagelliform-Seide, (3) Piriform-Seide, (4) Minor Ampullate-Seide, (5) Aggregat-Seide, (6) Tubiliform-Seide, (7) Aciniform-Seide.

Einer der Hauptbestandteile eines Radnetzes ist die *Dragline*-Seide (engl. *dragline* = Schleppseil). Die Proteine werden in der großen Ampullendrüse (*Major ampullate*) gebildet und die Fasern aufgrund der hohen Zugfestigkeit für den Rahmen und die Speichen des Netzes verwendet. Außerdem dient die *Dragline*-Seide der Spinne als Abseil- und Sicherungsfaden, zum Beispiel um Feinden zu entkommen (Aphisiart und Vollrath 1994; Gosline, Pollak *et al.* 1994; Vollrath und Porter 2006).

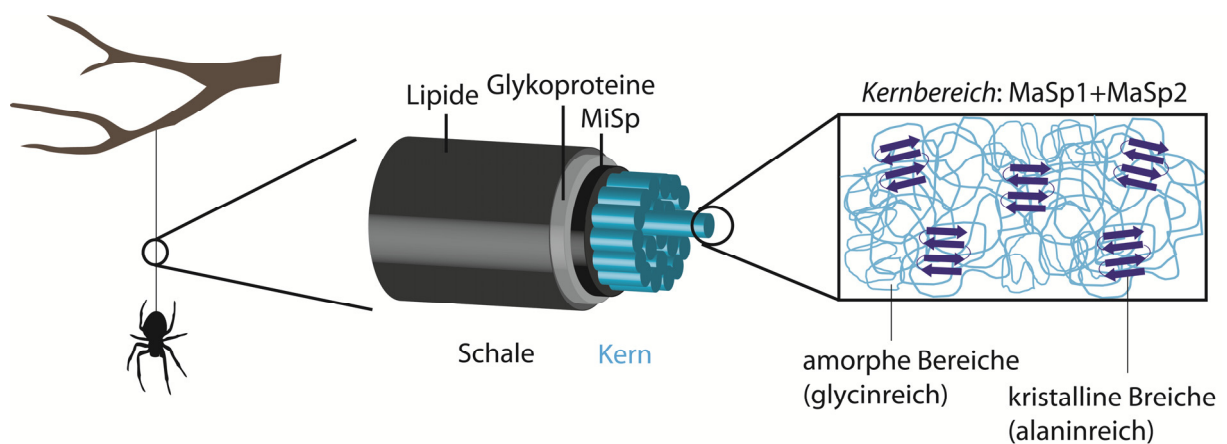
Ein zweiter wichtiger Bestandteil der Strukturen von Radnetzen ist die zu einer Fangspirale verarbeitete *Flagelliform*-Seide. Durch ihre hervorragende Dehnbarkeit von bis zu 270% kann die hohe kinetische Energie, die beim Aufprall einer Beute entsteht, dissipiert werden. (Gosline, Guerette *et al.* 1999; Scheibel 2004; Brooks, Steinkraus *et al.* 2005). Um das Konstrukt zu Beginn des Netzbaus zu stabilisieren, verwendet die Spinne eine Hilfsspirale aus *Minor Ampullate*-Seide, deren Proteine in der kleinen Ampullendrüse (*Minor ampullate*) gebildet werden. Diese Seidenart hat eine ähnliche Zusammensetzung wie die *Dragline*-Seide (Tillinghast und Townley 1994; Riekel und Vollrath 2001; Dicko, Knight *et al.* 2004; Humenik, Scheibel *et al.* 2011).

Die *Piriform*-Seide dient zur Verklebung von *Dragline*-Seide, *Minor Ampullate*-Seide und *Flagelliform*-Seide untereinander sowie zur Befestigung des Radnetzes an diversen Oberflächen (Zweige, Wände, etc.) (Hajer und Rehakova 2003; Heidebrecht und Scheibel 2013). Um die Beute an der Flucht zu hindern, wird die Fangspirale zusätzlich mit der Aggregatseide beschichtet, welche aus einer Mischung kleiner hygroskopischer Peptide und klebriger Glykoproteine besteht (Tillinghast und Townley 1994). Zum Schutz ihres Nachwuchses verwenden weibliche Radnetzspinnen zwei weitere Seidenarten: zum einem die *Tubiliform*-Seide, welche die Kokonschale bildet und als physikalische Barriere z.B. gegen Feinde oder Parasiten fungiert; zum anderen die *Aciniform*-Seide, die für die innere Kokonhülle, aber auch zum Einwickeln der Beute verwendet wird (Blackledge und Hayashi 2006; Huang, Lin *et al.* 2006; La Mattina, Reza *et al.* 2008).

### 1.2.2 STRUKTUR UND AUFBAU DER DRAGLINE-SEIDE

Im Fall des Abseilfadens von Radnetzspinnen führt die Kombination von hoher Zugfestigkeit und Dehnbarkeit zu einer Zähigkeit, welche derzeit von keinem anderen biologischen aber auch synthetischen Fasermaterial übertroffen wird (Gosline, Guerette *et*

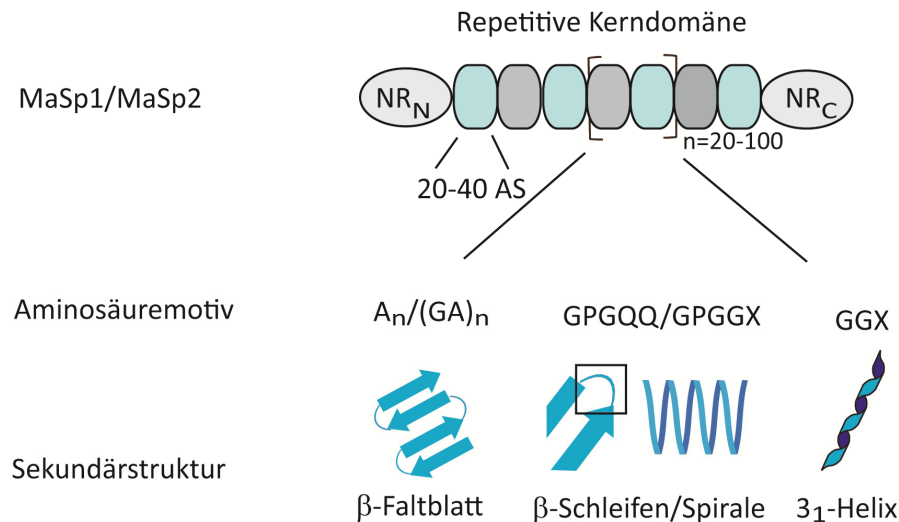
al. 1999; Heidebrecht und Scheibel 2013). Diese exzellenten mechanischen Eigenschaften basieren auf der molekularen Struktur und dem hierarchischen Aufbau, welcher drei Ebenen struktureller Ordnung widerspiegelt (Nova, Keten *et al.* 2010; Lintz und Scheibel 2013). Übergeordnet ist eine Kern-Schale Struktur zu erkennen, wobei sich die Hülle aus Lipiden, Glykoproteinen und der *Minor Ampullate*-Seide (MiSp) zusammensetzt (Frische, Maunsbach *et al.* 1998) (Abbildung 2). Diese zusätzliche Schutzschicht hat mehrere Funktionen. Zum einen dienen Glykoproteine als Schutz vor Austrocknung, zum anderen liefern Lipide einen antibakteriellen Schutz (Liu, Shao *et al.* 2005; Sponner, Vater *et al.* 2007). Der Kern besteht auf submikroskopischer Ebene aus Bündeln von Nano- und Mikro-Fibrillen, die entlang der Faserachse ausgerichtet sind (Augsten, Muhlig *et al.* 2000).



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Dragline-Seide.** Übergeordnet ist eine Kern-Schale Struktur zu erkennen. Der semikristalline fibrilläre Kern wird aus mindestens zwei Spidroinen der großen Ampullendrüse (MaSp1 und MaSp2) gebildet. Die Fibrillen bestehen aus kristallinen Bereichen, welche in einer amorphen Matrix eingebettet sind.

Diese semikristallinen Fibrillen werden aus hochgeordneten nanokristallinen Bereichen, welche in einer amorphen Matrix eingebettet sind, gebildet (van Beek, Hess *et al.* 2002; Papadopoulos, Solter *et al.* 2009). Kernspinresonanzspektroskopie und Röntgenbeugungsanalysen zeigten, dass sich die Kristalle aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern zusammenlagern und eine Größe von ca. 2 x 5 x 7 nm aufweisen (Kummerlen, van Beek *et al.* 1996; Simmons, Michal *et al.* 1996; Riekel, Muller *et al.* 1999; van Beek, Hess *et al.* 2002). Die kristallinen Bereiche haben einen Anteil von 11-35% am Gesamtvolumen des Fadens, wirken als multifunktionelle Quervernetzer und sind somit für die hohe Zugfestigkeit der Dragline-Seide verantwortlich (Grubb und Jelinski 1997; Lintz und Scheibel 2013). Die außergewöhnliche

Zähigkeit wird aber erst durch einen zweiten wichtigen Bestandteil erreicht, die Dehnbarkeit. Diese ist durch die amorphe Matrix aus  $\beta$ -Schleifen,  $\beta$ -Spiralen,  $3_1$ -Helices, sowie ungeordneten  $\beta$ -Faltblättern gegeben (Smith und Scheibel 2013).



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau der MA-Spidroine.** Gezeigt ist sowohl der generelle Aufbau der Proteine als auch deren unterschiedliche Aminosäuremotive und korrespondierende Sekundärstrukturelemente.

Der Kern des Abseilfadens besteht aus mindestens zwei Proteinklassen, den sogenannten Spidroinen (Sp), die in der großen Ampullendrüse (*Major Ampullate*, MA) gebildet und MaSp1 und MaSp2 genannt werden. Die beiden Proteinklassen unterscheiden sich jeweils in Hydrophobizität und Prolin-Gehalt. Die beiden Spidroine der europäischen Gartenkreuzspinne (*Araneus diadematus* Fibroin (ADF) 3 und 4) sind infolge des hohen Prolin Gehaltes von etwa 16% beide MaSp2 Analoga, zeigen hinsichtlich ihrer Hydrophobizität jedoch Unterschiede (Guerette, Ginzinger *et al.* 1996; Gatesy, Hayashi *et al.* 2001). So besitzen MaSp1 und ADF3 eine hohe Anzahl an hydrophilen Aminosäureresten, wohingegen MaSp2 und ADF4 als eher hydrophob bezeichnet werden können (Huemmerich, Scheibel *et al.* 2004; Humenik, Smith *et al.* 2011).

Dennoch weisen MA-Spidroine mehrere Gemeinsamkeiten auf (Abbildung 3). Zum einen weisen sie einen hoch repetitiven Kern auf, der von relativ kurzen, nicht repetitiven Termini (NR) flankiert ist. Zum anderen zeigen Spidroine ein hohes Molekulargewicht von 200 – 350 kDa und die repetitiven Kernregionen bestehen in beiden Fällen aus bis zu 50% aus den Aminosäuren Glycin und Alanin (Xu und Lewis 1990; Hinman und Lewis 1992; Rising,

Nimmervoll *et al.* 2005; Rising, Hjalms *et al.* 2006; Ayoub, Garb *et al.* 2007). Die Kernregion, welche 90% der Gesamtproteinsequenz darstellt, wird von sich bis zu 100-fach wiederholenden Modulen aus etwa 20-40 Aminosäuren (AS) gebildet (Guerette, Ginzinger *et al.* 1996; Hayashi, Blackledge *et al.* 2004). Diese Module wiederum setzen sich aus Blöcken aus Polyalaninen (A)<sub>n</sub> (n=4-12) und GGX (X=Y,L,Q) oder GPGXX (X= Q,G,Y) zusammen (Winkler und Kaplan 2000). Die alaninreichen Bereiche bilden antiparallele  $\beta$ -Faltblätter aus, wohingegen das GPGXX Motiv  $\beta$ -Schleifen bzw.  $\beta$ -Spiralen ausbildet und sich die GGX Blöcke vermutlich zu  $3_1$ -Helices anordnen (Thiel und Viney 1996; Brooks, Steinkraus *et al.* 2005).

Während der Kernbereich der MA-Spidroine für die makromolekularen Eigenschaften der Seide verantwortlich ist, spielen die beiden 100-150 Aminosäuren umfassenden Termini eine Schlüsselrolle sowohl bei der Lagerung der hochkonzentrierten wässrigen Spinnlösung, als auch bei der Fadenassemblierung (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Sowohl die Carboxy (NR<sub>C</sub>)- als auch die Aminotermine (NR<sub>N</sub>)-Domäne sind innerhalb von MA Spidroinen spezieübergreifend hoch konserviert (Motriuk-Smith, Smith *et al.* 2005; Rising, Hjalms *et al.* 2006; Garb, Ayoub *et al.* 2010). Es handelt sich bei beiden Termini um dimerisierungsfähige nicht repetitive globuläre Domänen, welche aus fünf  $\alpha$ -Helices bestehen (Askarieh, Hedhammar *et al.* 2010; Hagn, Eisoldt *et al.* 2010; Hagn, Thamm *et al.* 2011).

### 1.3 REKOMBINANTE SPINNENSEIDENPROTEINE

Spinnenseide ist aufgrund ihrer herausragenden mechanischen Eigenschaften, der guten Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit in den Fokus der Forschung gerückt. Um Seide für unterschiedliche Anwendungen nutzen zu können, sind ausreichende Mengen notwendig. Die Zucht von Spinnen ist, im Gegensatz zum Seidenspinner *B. mori*, aufgrund des kannibalischen und territorialen Verhaltens der Tiere nicht realisierbar (Fox 1975). Ferner ist die Gewinnung der Seide sehr zeitaufwendig und nicht in großem Maßstab durchführbar. Da zusätzlich die Seidenqualität der Spinnen durch Umwelteinflüsse, wie z.B. ihre Ernährung, beeinflusst wird, sind Qualitätsschwankungen ein weiteres Problem natürlicher Seide (Madsen, Shao *et al.* 1999; Craig, Riekel *et al.* 2000). Die biotechnologische Herstellung von Spinnenseide ermöglicht es hingegen, Proteine mit gleichbleibender Qualität in ausreichend großen Mengen zu produzieren (Heidebrecht und Scheibel 2013).

### 1.3.1 HERSTELLUNG

Um Spinnenseidenproteine rekombinant herzustellen, wurden prinzipiell zwei Routen etabliert. Zum einen konnten natürliche Spinnenseidengene in unterschiedlichen Wirtsorganismen (Prokaryoten aber auch Eukaryoten) exprimiert werden (Heidebrecht und Scheibel 2013). Dabei traten jedoch verschiedene Probleme auf, welche durch unterschiedliche *codon usage* der Spinnen und Prokaryoten zu einer Reduzierung der Proteinausbeute führten. Zusätzlich wurden polydisperse Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten durch oft auftretende homologe Rekombination von repetitiven Sequenzen produziert (Xu und Lewis 1990; Arcidiacono, Mello *et al.* 1998). Auch der Versuch Spinnenseidengene in eukaryotischen Wirten zu exprimieren war durch Reinigungsprobleme und geringe Ausbeuten nicht erfolgreich (Lazaris, Arcidiacono *et al.* 2002; Menassa, Hong *et al.* 2004).

Die zweite, vielversprechendere Route ist die rekombinante Herstellung von Proteinen, die von natürlichen Spinnenseidenproteinen abgeleitet wurden. Basierend auf den Konsensussequenzen der natürlichen Proteine können so bezüglich *codon usage* und Proteinlänge optimierte Gene designt werden (Vendrely und Scheibel 2007). Obwohl die so hergestellten Proteine in Aminosäuresequenz und Größe zu den natürlichen nicht identisch sind, besitzen sie trotzdem deren wesentliche Merkmale, wie z.B. intrinsisch entfaltete lösliche Strukturen, Selbstassemblierung und  $\beta$ -Faltblatt-reiche unlösliche Formen. Ein Überblick über die jüngsten Versuche ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Übersicht über die Herstellung artifizieller Spinnenseidenproteine in unterschiedlichen Wirtsorganismen** (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Modifiziert nach *Biotechnology of Silk* 2014, 5, 179-2 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Science und Business Media.

Seidenart	Ursprung	MW [kDa]	Wirtsorganismus	Referenzen
MaSp1	<i>L. hesperus</i>	N/A	<i>S. typhimurium</i>	(Widmaier, Tullman-Ercek <i>et al.</i> 2009; Widmaier und Voigt 2010)
	<i>N. clavipes</i>	100-285	<i>E. coli</i>	(Xia, Ki <i>et al.</i> 2010)
	<i>N. clavipes</i>	15-26	<i>E. coli</i>	(Winkler, Szela <i>et al.</i> 1999; Szela, Avtges <i>et al.</i> 2000)
	<i>N. clavipes</i>	45-60	<i>E. coli</i>	(Bini, Foo <i>et al.</i> 2006; Wong Po Foo, Patwardhan <i>et al.</i> 2006; Huang, Wong <i>et al.</i> 2007)
	<i>N. clavipes</i>	10-20	<i>E. coli</i>	(Fukushima 1998)
MaSp2	<i>A. aurantia</i>	63-71	<i>E. coli</i>	(Brooks, Stricker <i>et al.</i> 2008; Teulé, Cooper <i>et al.</i> 2009)
	N/A	31-112	<i>E. coli</i>	(Lewis, Hinman <i>et al.</i> 1996)
MaSp2/Flag	<i>N. clavipes</i>	58, 62	<i>E. coli</i>	(Teule, Furin <i>et al.</i> 2007)
MaSp1 & MaSp2	<i>L. hesperus</i>	14	<i>E. coli</i>	(Hagn, Thamm <i>et al.</i> 2011)
	<i>N. clavipes</i>	20-56	<i>E. coli</i>	(Arcidiacono, Mello <i>et al.</i> 2002; Mello, Soares <i>et al.</i> 2004)
	<i>N. clavipes</i>	N/A	<i>B. subtilis</i>	(Fahnestock 1994)
	<i>N. clavipes</i>	55, 67	<i>E. coli</i>	(Brooks, Nelson <i>et al.</i> 2008)
	<i>N. clavipes</i>	15-41	<i>E. coli</i>	(Prince, Mcgrath <i>et al.</i> 1995)
	<i>N. clavipes</i>	65-163	<i>E. coli</i>	(Fahnestock und Irwin 1997)
ADF3, ADF4	<i>A. diadematus</i>	34-106	<i>E. coli</i>	(Huemmerich, Helsen <i>et al.</i> 2004; Schmidt, Romer <i>et al.</i> 2007)
ADF1-ADF4	<i>A. diadematus</i>	25-56	<i>S. typhimurium</i>	(Widmaier, Tullman-Ercek <i>et al.</i> 2009; Widmaier und Voigt 2010)
Flag	<i>N. clavipes</i>	N/A	<i>S. typhimurium</i>	(Widmaier, Tullman-Ercek <i>et al.</i> 2009; Widmaier und Voigt 2010)
	<i>N. clavipes</i>	14-94	<i>E. coli</i>	(Vendrelly, Ackerschott <i>et al.</i> 2008; Heim, Ackerschott <i>et al.</i> 2010)
	<i>N. clavipes</i>	25	<i>E. coli</i>	(Zhou, F. <i>et al.</i> 2001)

Abkürzungen: MaSp = *Major Ampullate Spidroin*; ADF = *Araneus diadematus fibroin*; Flag = Flagelliform; MW = Molekulargewicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Varianten von eADF4 (*engineered ADF4*) wurden mit diesem Ansatz entwickelt. Dafür wurde die von ADF4 abgeleitete Konsensussequenz durch reverse Translation unter Berücksichtigung der *codon usage* des Wirtsorganismus (*E. coli*) in eine Nukleotidsequenz übersetzt. Das daraus entstehende Modul (C-Modul) kann mittels einer nahtlosen Klonierungsstrategie multimerisiert und in einen Expressionsvektor transformiert werden (Huemmerich, Helsen *et al.* 2004). Diese naturähnlichen Seidenkonstrukte können nun in *E. coli* durch Fermentation exprimiert und auf biotechnologischem Weg in ausreichenden Mengen produziert werden.



Das hier vorrangig behandelte rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16), in dem das C-Modul 16 mal wiederholt wurde, entspricht dabei einer artifiziellen Version des repetitiven Kernbereichs von ADF4 ohne Berücksichtigung der terminalen Domänen und ist vergleichbar mit einem Multiblockcopolymer aus Polyalanin Blöcken und Glycin-reichen Bereichen (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Aufbau des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16).** Basierend auf dem repetitiven Kernbereich des *Dragline*-Seidenproteins ADF4 der europäischen Gartenkreuzspinne (*A. diadematus*) wurde eine Konsensussequenz (C-Modul) abgeleitet. Das so generierte Protein eADF4(C16) beinhaltet 16 C Module sowie einen aminoterminalen T7-tag (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Modifiziert nach *Biotechnology of Silk* **2014**, 5, 179-2 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Science und Business Media.

### 1.3.2 REKOMBINANTE SPINNENSEIDENPROTEINE ALS BIOMATERIAL

Natürliche Spinnenseide ist biokompatibel, bioabbaubar und hypoallergen. Diese Eigenschaften machten sich die Menschen schon in der Vergangenheit zu Nutze. Da Spinnennetze dazu in der Lage sind Blutungen von Wunden zu stoppen und den Heilungsprozess zu fördern, wurden sie bereits früher als Wundauflagen verwendet (Bon 1710). Durch die rekombinante Herstellung von Spinnenseidenproteinen in ausreichenden Mengen und gleichbleibender Qualität ist heutzutage ein Einsatz als vielfältiges Biomaterial möglich. Da die Möglichkeit besteht, das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) in verschiedene Morphologien zu überführen, lassen sich die Anwendungsbereiche zusätzlich erweitern. Die aktuelle Forschung befasst sich mit einer Applikation als

Implantatbeschichtungen, Gerüste im Bereich des *tissue engineering*, Wundauflagen sowie einem Einsatz im Bereich des gerichteten Wirkstofftransports.

### **1.3.2.1 ASSEMBLIERUNG IN VERSCHIEDENE MORPHOLOGIEN**

Das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) kann durch Selbstassemblierung unter verschiedenen Bedingungen in unterschiedliche Morphologien, wie Fibrillen, Partikel, Kapseln, Filme oder Hydrogele überführt werden (Abbildung 5) (Hardy, Römer *et al.* 2008; Slotta, Rammensee *et al.* 2008; Schacht und Scheibel 2011). Dabei wird der Übergang einer ungeordneten Struktur in Lösung, in eine geordnete unlösliche Phase unter anderem durch Änderung der Temperatur, des pH- Wertes, Salz-Zugabe oder auch durch Scherkräfte gesteuert. Da eADF4(C16) vereinfacht als amphiphiles, negativ geladenes Multiblockcopolymer betrachtet werden kann, wird im Folgenden kurz die Assemblierung von Blockcopolymeren beschrieben.

#### **1.3.2.1.1 Selbstorganisation von Blockcopolymeren**

In Blockcopolymeren sind zwei Segmente unterschiedlicher Löslichkeit kovalent miteinander verbunden. Die dadurch entstehende Entmischungstendenz ist durch die kovalente Bindung zwischen den hydrophilen und hydrophoben Blöcken nur auf der Längenskala der Moleküle möglich und es kommt zu einer Mikrophasenseparation (Förster und Plantenberg 2002; Darling 2007; Rabotyagova, Cebe *et al.* 2011). Die Selbstorganisation findet sowohl in Lösung, als auch in lyotropen flüssigkristallinen sowie festen Phasen statt (Förster und Plantenberg 2002).

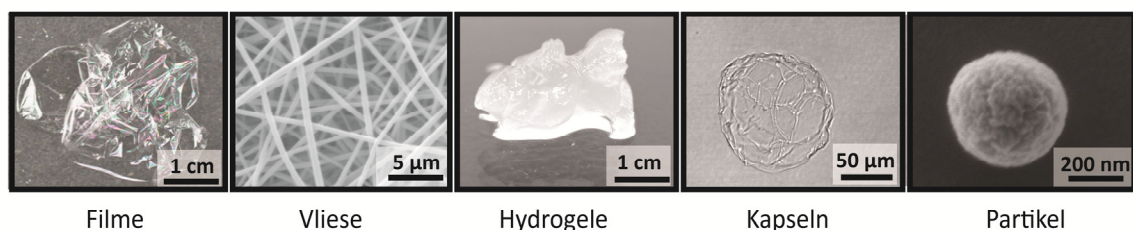
In verdünnten Lösungen bilden amphiphile Blockcopolymere sphärische oder zylindrische Mizellen oder Vesikel (Darling 2007; Kita-Tokarczyk, Junginger *et al.* 2011). Durch die chemische Struktur der Blockcopolymere kann die Selbstassemblierung dabei sowohl in polaren (z.B. Wasser) als auch in unpolaren Lösungsmitteln (z.B. Silikonöl) erfolgen. Lyotrope flüssigkristalline Phasen von Blockcopolymeren werden durch eine Erhöhung der Konzentration erreicht. Dabei können unter anderem kubische Phasen mit sphärischen Mizellen und hexagonal angeordneten zylinderförmigen Mizellen beobachtet werden (Förster, Berton *et al.* 2001; Förster und Plantenberg 2002).

Auch in festen Phasen führt die Entmischungstendenz der beiden unterschiedlichen Blöcke zu einer Mikrophasenseparation, wobei verschiedene Strukturen durch Selbstorganisation

gebildet werden können. Darunter sind unter anderem kubisch innenzentriert (*fcc*) - und kubisch flächenzentriert (*bcc*) angeordnete Sphären, hexagonal gepackte Zylinder und Lamellen möglich (Förster und Plantenberg 2002). Die Phasenseparation wird dabei im Wesentlichen vom Polymerisationsgrad  $N$ , dem relativen Anteil  $f$  der Blöcke im Polymer und dem temperaturabhängigen Flory-Huggins Parameter  $\chi_{AB}$  bestimmt (Bates und Fredrickson 1990; Fredrickson und Bates 1996). Der Flory-Huggins Parameter stellt ein Maß für die Unverträglichkeit der beiden Blöcke dar. Je größer sein Wert, desto größer ist das Bestreben zur Mikrophasenseparation. Der durch die Phasenseparation hervorgerufene Entropieverlust hat bei höherem Polymerisationsgrad einen geringeren Einfluss (Rabotyagova, Cebe *et al.* 2011). Deshalb bestimmt das Produkt aus dem Flory-Huggins Parameter und dem Polymerisationsgrad das Ausmaß der Separation (Fredrickson und Bates 1996). Der relative Anteil der Blöcke zueinander, bestimmt im Fall einer Mikrophasenseparation die Morphologie der Blockcopolymeren (Rabotyagova, Cebe *et al.* 2011).

#### 1.3.2.1.2 Herstellung verschiedener eADF4(C16) Morphologien

Im Fall von Protein-basierten Blockcopolymeren hängt die Phasenseparation nicht nur von den oben beschriebenen Parametern ab. Da durch die Möglichkeit der Proteinfaltung unterschiedlich hydrophobe oder hydrophile Bereiche exponiert werden können, wird die supermolekulare Struktur eines makromolekularen Assemblates auch durch die Sekundärstrukturelemente des Proteins bestimmt (Branco und Schneider 2009; Rabotyagova, Cebe *et al.* 2011). Die Phasenseparation und Sekundärstruktur der Spinnenseidenproteine wird des Weiteren durch Umgebungsbedingungen beeinflusst, wodurch eine Assemblierung in verschiedene Morphologien erfolgt (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Unterschiedliche Morphologien von eADF4(C16).**

So bilden Seidenproteine beim natürlichen Spinnprozess Mizellen-artige Assemblate mit flüssigkristallinem Charakter in hoch konzentrierten wässrigen Lösungen (Willcox, Gido *et al.* 1996; Vollrath und Knight 2001; Eisoldt, Smith *et al.* 2011). Durch physiko-chemische Veränderungen (Wasserentzug, Austausch von chaotropen Natrium- und Chloridionen gegen kosmotrope Kalium- und Phosphationen, Absenkung des pH-Wertes sowie das Auftreten von Scherkräften) wird ein Phasenübergang (flüssig-fest) induziert und ein Seidenfaden mit hochgeordneten Strukturen gebildet (Eisoldt, Smith *et al.* 2011).

Aber auch im Fall des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF4(C16) kann man sich die amphiphilen Eigenschaften zu nutze machen. Stellt man Emulsionen einer wässrigen Proteinlösung in einer Öl-Phase her, assembliert eADF4(C16) an der Grenzfläche (Hermanson, Harasim *et al.* 2007; Hermanson, Huemmerich *et al.* 2007). Durch zusätzliche Induzierung von  $\beta$ -Faltblatt Strukturen (z.B. durch Ethanol Behandlung) können so stabile Kapseln hergestellt werden, welche unter anderem dafür verwendet werden biologisch aktive Substanzen (z.B. Enzyme oder Wirkstoffe) von der Umgebung zu separieren und zu schützen und durch Kontrolle der Stoffpermeation zu aktivieren (Blüm, Nichtl *et al.* 2013).

Weitere Morphologien von eADF4(C16) stellen Partikel und Fibrillen dar. Beide können durch Zugabe von kosmotropen Ionen (z.B. Kaliumphosphat) aus wässrigen Proteinlösungen hergestellt werden, in welchen das Protein eADF4(C16) intrinsisch ungefaltet vorliegt. Durch Zugabe von kosmotropen Salzen in hohen Konzentrationen (> 400 mM) wird die Hydrathülle des Proteins entzogen. Die damit verbundene Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen induziert eine Phasenseparation in eine proteinreiche und eine lösungsmittelreiche Phase. Nach Erreichen einer kritischen Proteinkonzentration in der proteinreichen Phase bilden sich Nukleationskeime, welche zu kugelförmigen Strukturen heranwachsen bis das Löslichkeitsgleichgewicht erreicht ist. Die Größe der resultierenden Partikel kann dabei durch die Proteinkonzentration und die Mischgeschwindigkeit in einem Bereich von 200 nm – 3  $\mu$ m beeinflusst werden (Slota, Rammensee *et al.* 2008; Blüm und Scheibel 2012). Da die Partikel sowohl mit wasserunlöslichen als auch wasserlöslichen niedermolekularen Wirkstoffen beladen werden können, ist ein Einsatz im Bereich des kontrollierten Wirkstofftransports möglich (Liebmann, Huemmerich *et al.* 2008; Lammel, Schwab *et al.* 2011; Blüm und Scheibel 2012).

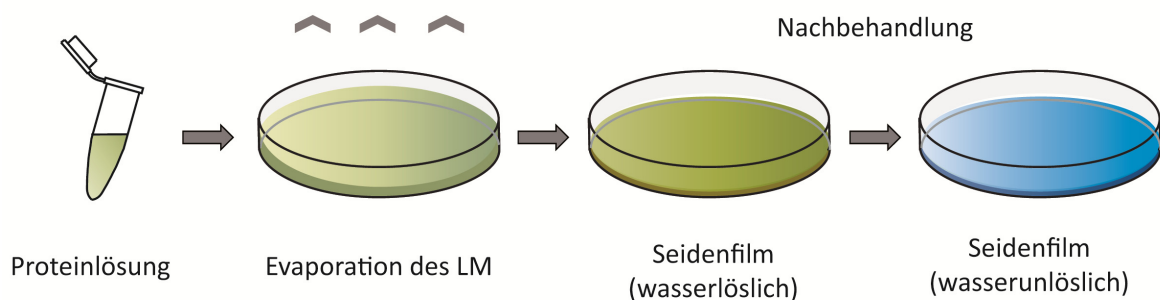
Werden zu einer wässrigen eADF4(C16) Lösung kosmotrope Salze in geringen Konzentrationen ( $< 300 \text{ mM}$ ) zugegeben, entstehen Nanofibrillen (Rammensee, Huemmerich *et al.* 2006). Dabei wird die Coulombsche Abstoßung durch Maskierung der negativ geladenen Glutamate reduziert, wodurch die Interaktion zwischen den Proteinen erhöht wird. Nach Bildung von Oligomeren bis zur kritischen Größe eines Nukleationskeims wachsen durch Anlagerung von weiteren Monomeren Fibrillen (Rammensee, Huemmerich *et al.* 2006; Slotta, Hess *et al.* 2007; Slotta, Rammensee *et al.* 2008; Humenik und Scheibel 2014).

Hydrogele stellen eine der größten durch Selbstassemblierung von eADF4(C16) gebildeten Strukturen dar und bestehen aus dreidimensionalen Netzwerken von physikalisch quervernetzten Fibrillen (Rammensee, Huemmerich *et al.* 2006; Branco und Schneider 2009; Schacht und Scheibel 2011). Durch einstellbare mechanische Eigenschaften und Porengrößen ist ein Einsatz von eADF4(C16)-Hydrogelen im Bereich der Wirkstofffreisetzung, als Wundauflagen oder als Gerüst im *tissue engineering* denkbar.

#### **1.3.2.1.3 eADF4(C16) Filme**

Proteinfilme können mittels Gießen (*drop casting*), durch Sprühbeschichtung (*spray coating*), Rotationsbeschichtung (*spin coating*), Tauchbeschichtung (*dip coating*) und Rakeln hergestellt werden (Slotta, Tammer *et al.* 2006; Metwalli, Slotta *et al.* 2007; Spiess, Wohlrab *et al.* 2010). Eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Seidenfilm-Herstellung ist das *drop casting*. Dabei wird nach Gießen einer Seidenproteinlösung auf ein Substrat das Lösungsmittel verdampft. Während der Verdunstung des Lösungsmittels und einer damit verbundenen Erhöhung der Proteinkonzentration kommt es zu einer partiellen Separation der kristallisierbaren, Polyalanin-reichen hydrophoben Bereiche von den hydrophilen Glycin-reichen Blöcken (Mesophase mit flüssig-kristallinem Charakter) (Hu, Lu *et al.* 2009). Dabei bilden die hydrophoben Polyalanin-Bereiche teilweise bereits  $\beta$ -Faltblätter aus. Durch die steigende Viskosität wird dieser metastabile Zustand eingefroren, weshalb der Film zu diesem Zeitpunkt noch wasserlöslich ist. Durch Nachbehandlung (z.B. mit Kaliumphosphat) wird das gebundene Wasser entzogen und es erfolgt die Bildung von inter- und intramolekularen Wasserstoffbrücken, welche die  $\beta$ -Faltblattbildung in den bislang nicht kristallinen Poly-Alanin reichen Abschnitten vollenden. Die resultierenden Filme sind

wasserstabil und bestehen aus in einer amorphen Matrix eingebetteten  $\beta$ -Faltblatt Nanokristallen (Metwalli, Slotta *et al.* 2007; Spiess, Ene *et al.* 2011) (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Herstellung von Filmen aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16).** Nach Evaporation des Lösungsmittels entsteht ein transparenter Seidenfilm, welcher wahlweise nachbehandelt werden kann.

Auf diese Weise können transparente Seidenfilme aus unterschiedlichen Lösungsmitteln wie zum Beispiel Hexafluoroisopropanol (HFIP) und Ameisensäure (*formic acid*, FA), aber auch aus wässrigen Lösungen (wL) und ionischen Flüssigkeiten (IL) hergestellt werden (Gupta, Khokhar *et al.* 2007; Spiess, Ene *et al.* 2011). Je nach verwendetem Lösungsmittel weisen die unbehandelten Filme unterschiedliche Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente auf. So induziert HFIP in eADF4(C16) Filmen einen höheren Anteil an  $\alpha$ -Helices, während Ameisensäure einen größeren  $\beta$ -Faltblattanteil hervorruft (Spiess, Ene *et al.* 2011). In nachbehandelten Filmen ist der  $\beta$ -Faltblattanteil hingegen unabhängig vom zuvor verwendeten Lösungsmittel und Nachbehandlungsmethode immer gleich, da der thermodynamisch günstigste Zustand erreicht wurde. Die Nachbehandlung von Seidenfilmen kann wahlweise mittels Alkohol (Methanol, Ethanol, etc.), kosmotropen Salzen (Kaliumphosphat, Ammoniumsulfat, etc.), Temperaturerhöhung oder Wasserdampf erfolgen (Hu, Shmelev *et al.* 2011; Spiess, Ene *et al.* 2011).

Anwendungen von Seidenfilmen als Biomaterial sind im Bereich von Wundauflagen, Implantatbeschichtungen und des kontrollierten Wirkstofftransports zu finden (Hofmann, Foo *et al.* 2006; Jiang, Wang *et al.* 2007; Wang, Hu *et al.* 2007; Liu, Miao *et al.* 2010; Pritchard, Valentin *et al.* 2011). Des Weiteren können Seidenfilme als Trägermaterial für ultradünne elektronische Implantate dienen (Kim, Vivoti *et al.* 2010). Durch Nano- und Mikro-Strukturierung der Seidenfilme kann das Anwendungsspektrum zusätzlich erweitert

werden (Young, Gupta *et al.* 2012; Brenckle, Tao *et al.* 2013; Kurland, Dey *et al.* 2013). Nanostrukturierte Filme können unter anderem als Biosensoren dienen, mikrostrukturierte Filme können dazu verwendet werden gezielt Zellen auszurichten und so zum Beispiel als Hornhautimplantat eingesetzt werden (Amsden, Perry *et al.* 2009; Lawrence, Marchant *et al.* 2009; Amsden, Domachuk *et al.* 2010; Gil, Park *et al.* 2010; Tien, Gil *et al.* 2012).

Die Herstellung solcher strukturierter Seidenfilme kann durch diverse Methoden erfolgen. Die meisten erfordern als erstes die Herstellung einer Matrize, welche mittels Foto-, Elektronenstrahl- oder Ionenstrahlolithographie produziert wird. Mit dieser Matrize wird anschließend ein Polydimethylsiloxan (PDMS) Stempel erzeugt, der alternativ auch durch kontrollierte Faltenbildung (*wrinkling*) hergestellt werden kann (Pretzl, Schweikart *et al.* 2008; Qin, Xia *et al.* 2010). Die eigentliche Herstellung des strukturierten Seidenfilms erfolgt anschließend durch *soft lithography* Techniken. Zum einem können Proteine mit *microcontact printing* ( $\mu$ CP) auf die gewünschte Oberfläche übertragen werden, zum anderen können die Filme auch mittels Mikroabformung (*micro-molding*) hergestellt werden (Qin, Xia *et al.* 2010). Letzteres kann durch Lösungsmittel unterstütztes (*solvent-assisted micro-molding*, SAMIM), kapillartransferierende Lithographie (CTL) oder auch durch Abformung in Kapillaren (*micro-molding in capillaries*, MIMIC) erfolgen (Kim, Xia *et al.* 1996; Xia, Kim *et al.* 1996; Kelleher, Jongerius *et al.* 2012; Young, Gupta *et al.* 2012).

### 1.3.2.1.3 Vliese aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen

Eine weitere Möglichkeit, zweidimensionalen Seidenoberflächen eine Struktur zu geben, stellt das Elektrosponnen dar. Damit können Vliese mit großen Faserzwischenräumen und unterschiedlichen Faserdurchmessern (einige Nanometer bis wenige Mikrometer) kostengünstig hergestellt werden (Frenot und Chronakis 2003). Infolge des Extrudierens einer Seidenlösung durch eine Spritze und Anlegen einer Spannung in der Größenordnung von mehreren Kilovolt bildet sich an der Nadelspitze ein kegelförmiger Tropfen (Taylor Konus) und ein dünner Strahl löst sich, welcher zur Gegenelektrode beschleunigt wird. Auf dem Weg zur Kollektorplatte verdunstet das Lösungsmittel und die Fasern können als Vlies gesammelt werden (Huang, Zhang *et al.* 2003; Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Der Faserdurchmesser kann mittels Konzentration und Viskosität der Lösung, Salzgehalt, Abstand zur Gegenelektrode, Oberflächenspannung des Lösungsmittels, Temperatur, Luftfeuchtigkeit sowie durch das Seidenprotein selbst kontrolliert werden (Greiner und Wendorff 2007;

Heikkilä und Harlin 2008; Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Um eine kontinuierliche Faserbildung zu garantieren, muss die Konzentration der Proteinlösung hoch genug sein, um bereits in der Spinnlösung eine Verschränkung der Proteine zu gewährleisten (Chengjie, Zhengzhong *et al.* 2009). Auf diese Weise wurden unterschiedliche Seiden, wie zum Beispiel die Seide des Seidenspinners *B. mori*, regenerierte *N. clavipes* Dragline-Seide und seidenähnliche-Polymere aus unterschiedlichen Lösungsmitteln (HFIP, Ameisensäure, Hexafluoracetone) versponnen (Buchko, Chen *et al.* 1999; Jin, Fridrikh *et al.* 2002; Zarkoob, Eby *et al.* 2004). Es ist aber auch möglich Vliese aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen, wie eADF4(C16), herzustellen (Bini, Foo *et al.* 2006; Foo, Patwardhan *et al.* 2006; Leal-Egana, Lang *et al.* 2012).

### 1.3.2.2 FUNKTIONALISIERUNG VON SEIDENPROTEINEN

#### 1.3.2.2.1 Genetische Modifikation

In rekombinanten Spinnenseidenproteinen können durch genetische Modifikation gezielt einzelne Aminosäuren mutiert oder auch ganze Aminosäuresequenzen eingeführt werden. Dadurch ist es möglich Seidenproteine für verschiedene Anwendungen spezifisch zu funktionalisieren (Tabelle 2) (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014).

**Tabelle 2: Unterschiedliche Spinnenseiden Fusionsproteine für diverse Anwendungen** (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Modifiziert nach *Biotechnology of Silk* 2014, 5, 179-2 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Science und Business Media.

Fusionsprotein	Anwendung	Referenzen
Seide + Siliziumdioxid bindende Peptide	Knochenersatzmaterial	(Foo, Patwardhan <i>et al.</i> 2006; Mieszawska, Nadkarni <i>et al.</i> 2010; Belton, Mieszawska <i>et al.</i> 2012)
Seide + Dentin Matrix Protein	Knochenersatzmaterial	(Huang, Wong <i>et al.</i> 2007)
Seide + RGD Peptide	Diverse biomedizinische Anwendungen	(Bini, Foo <i>et al.</i> 2006; Morgan, Roskov <i>et al.</i> 2008; Wohlrab, Mueller <i>et al.</i> 2012)
Seide + Poly(L-Lysin)	Wirkstofftransport	(Numata, Subramanian <i>et al.</i> 2009) (Numata, Mieszawska-Czajkowska <i>et al.</i> 2012)
Seide + Poly(L-Lysin) + zellpenetrierendes Peptid	Wirkstofftransport	(Numata und Kaplan 2010)
Seide + antimikrobielle Domäne	Geweberekonstruktion	(Currie, Deschaume <i>et al.</i> 2011; Gomes, Leonor <i>et al.</i> 2011)



Um *scaffolds* für die Knochenregeneration zu entwickeln, wurden zum einen Fusionsproteine aus Seide (*N. clavipes* Dragline-Seide) und Siliziumdioxid bindenden Peptiden (R5: SSKKSGSYSGSKGSKRRIL; A1: SGSKGSKRRIL; Si4-1: MSPHPHPRHHHT) produziert. Zum anderen wurde basierend auf MaSp1 von *N. clavipes* ein Fusionsprotein mit dem Dentin Matrix Protein 1 hergestellt (Foo, Patwardhan *et al.* 2006; Huang, Wong *et al.* 2007; Mieszawska, Nadkarni *et al.* 2010; Belton, Mieszawska *et al.* 2012). Nach Prozessierung der Hybridproteine zu Filmen und Behandlung mit Kieselsäure bzw. simulierter Körperflüssigkeit (*simulated body fluid*, SBF) wurde in beiden Fällen eine Biomineralisierung der organischen Matrix beobachtet (Foo, Patwardhan *et al.* 2006; Huang, Wong *et al.* 2007).

Zur Entwicklung von Gentransfersystemen, welche im Zuge der Gentherapie einen Nukleinsäuretransfer durch die Zellmembran ermöglichen sollen, wurden Seidenproteine mit Poly(L-Lysin) fusioniert. Um die Effektivität weiter zu erhöhen wurden zusätzlich zellpenetrierende Peptide (z.B. ppTG1) integriert (Numata, Subramanian *et al.* 2009; Numata und Kaplan 2010; Numata, Mieszawska-Czajkowska *et al.* 2012). So hergestellte Komplexe aus Seiden-Poly(L-Lysin)-ppTG1 Protein und Plasmid-DNA zeigten eine Transfektionseffizienz, die vergleichbar mit dem kommerziellen Reagenz Lipofectamine 2000 ist (Numata und Kaplan 2010).

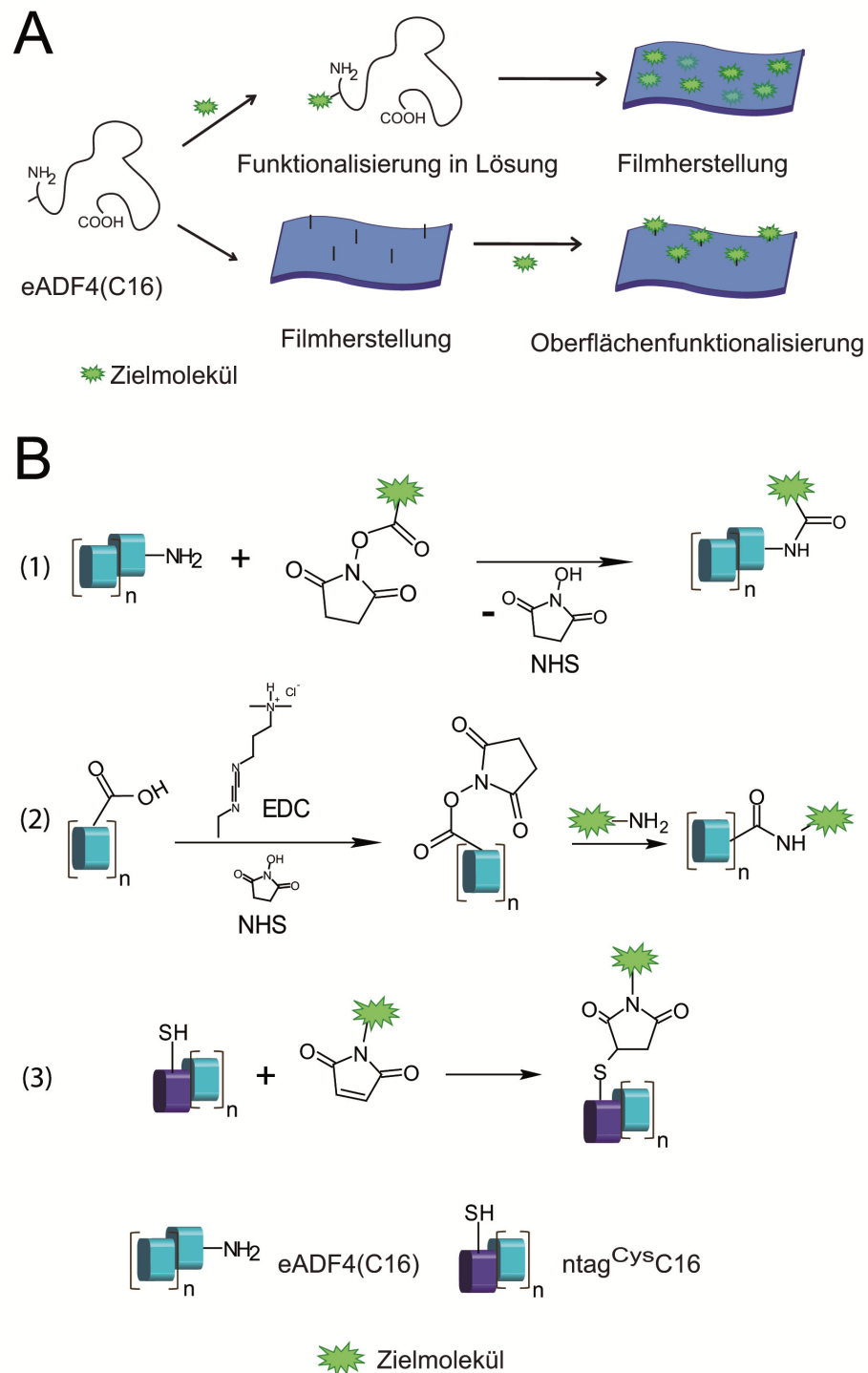
Da die Interaktion von Zellen mit unterschiedlichen Materialoberflächen für biomedizinische Anwendungen von großer Bedeutung ist, wurden eine Reihe von Fusionsproteinen aus Spinnenseidenproteinen und Zelladhäsionssequenzen (z.B. RGD) entwickelt (Bini, Foo *et al.* 2006; Morgan, Roskov *et al.* 2008). Da diese Art der Integration auf lineare RGD Sequenzen beschränkt ist, cyclische RGD Peptide jedoch eine höhere Selektivität aufweisen, wurde auch eine chemische Modifikation getestet (Dunehoo, Anderson *et al.* 2006; Heckmann und Kessler 2007; Mas-Moruno, Rechenmacher *et al.* 2010).

### 1.3.2.2 Chemische Modifikation

Durch chemische Funktionalisierung ist es möglich eine große Vielfalt an Molekülen kovalent mit Seidenproteinen zu verknüpfen (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Obwohl rekombinante Spinnenseidenproteine drastische Reaktionsbedingungen (z.B. organische Lösungsmittel oder hohe Temperaturen) erlauben, sollten für biomedizinische

Anwendungen die Modifikationen in wässrigen Lösungen und möglichst ohne Zusatz von toxischen Substanzen ablaufen (Sletten und Bertozzi 2009). Trotz der Tatsache, dass Seidenproteine bis zu 50% aus den nicht-reaktiven Aminosäuren Alanin und Glycin bestehen, erlauben Glutaminsäure und Tyrosin dennoch spezifische chemische Modifikationen. Da sie des Weiteren in wässrigen Lösungen intrinsisch ungefaltet vorliegen, ist deren Funktionalisierung oftmals leichter als die globulärer Proteine (Vendrely und Scheibel 2007; Humenik, Smith *et al.* 2011; Wohlrab, Thamm *et al.* 2014).

Generell ist die chemische Modifikation von rekombinanten Spinnenseidenproteinen sowohl in wässrigen Lösungen als auch nach der Prozessierung in verschiedene Morphologien möglich (Abbildung 7 A). Durch Modifikation der Seitenkette von Glutaminsäure ist es möglich neben kleinen organischen Molekülen wie Fluorescein auch biologisch aktive Makromoleküle wie Enzyme auf eADF4(C16) Filmen zu immobilisieren (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Auf diese Weise konnte nach Aktivierung der Carboxylgruppen (eine pro repetitive Einheit sowie der C-Terminus) mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid / *N*-Hydroxysuccinimid (EDC/NHS) das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase erfolgreich gekoppelt werden (Huemmerich, Slotta *et al.* 2006). Da oftmals nur ein Target pro Protein erwünscht ist und eADF4(C16) keine weiteren primären Amine enthält, kann durch die einstufige Reaktion mit *N*-Hydroxysuccinimid aktivierten Carbonsäuren (NHS-Ester) eine spezifische Funktionalisierung des Aminoterminus erfolgen (Schacht und Scheibel 2011; Humenik und Scheibel 2014). Zur Erweiterung des Reaktionsspektrums, wurde durch Einführung eines kurzen *tags* (GCGGSGGGGSGGGG, ntag<sup>Cys</sup>) eine Cystein beeinhaltende Variante (ntag<sup>Cys</sup>C16) von eADF4(C16) hergestellt (Spiess, Wohlrab *et al.* 2010). Neben der Möglichkeit mit Thiolen redox-sensitive und somit reversible kovalente Bindungen zu erzeugen, kann des Weiteren mittels Maleimid eine spezifische und effektive Verknüpfung von Protein und Zielmolekül erfolgen. Bei der Reaktion von Cysteinen mit Maleimid bildet sich mittels einer Michael-analogen Addition an das  $\alpha$ ,  $\beta$  - ungesättigte System des Maleimids ein stabiler Thioether (Heitz, Anderson *et al.* 1968; Partis, Griffiths *et al.* 1983). Nach Prozessierung von ntag<sup>Cys</sup>C16 in Filme konnten bereits erfolgreich Fluorescein, Nanogoldpartikel und  $\beta$ -Galaktosidase immobilisiert werden (Spiess, Wohlrab *et al.* 2010).



**Abbildung 7: Chemische Modifikation von rekombinanten Spinnenseidenproteinen.** (A) Die Funktionalisierung kann sowohl in Lösung als auch an prozessierten Morphologien erfolgen. (B) Die Modifikation von eADF4(C16) kann einerseits mittels NHS-Estern am N-Terminus erfolgen (1), andererseits können Carboxylgruppen nach EDC/NHS Aktivierung mit verschiedenen primären Aminen reagieren (2). Die Thiolgruppe in ntag<sup>Cys</sup>C16 kann mittels Maleimid funktionalisiert werden (3) (Wohlrab, Thamm *et al.* 2014). Modifiziert nach *Biotechnology of Silk* **2014**, 5, 179-2 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Springer Science und Business Media.

## 1.4 FLORFLIEGENSEIDE

Für ein erweitertes Anwendungspotential werden neben Spinnenseidenproteinen auch Florfliegenseidenproteine rekombinant produziert. Im Gegensatz zu anderen Insekten, welche ausschließlich einen Seidentyp produzieren, sind Florfliegen (*Chrysopidae*) in der Lage zwei Arten von Seide herzustellen. Zum einen spinnen die Larven einen Kokon aus Seide. Dieser doppelwandige Kokon besteht aus einer Schale aus lose gewebten Seidenfasern, sowie einer inneren Schicht aus Lipiden. Dabei gewährleisten die Seidenfasern mechanische Stabilität, wohingegen Lipide den Wasserverlust während der Metamorphose verhindern (Weisman, Trueman *et al.* 2008). Zum anderen setzen weibliche Florfliegen ihre Eier auf einem Seidenstiel ab (Abbildung 8 B). Durch Eintauchen des Eis in die konzentrierte Seidenlösung und anschließendem Wegziehen des Abdomens bildet sich zwischen Tropfen und Ei ein Seidenfaden. Durch diesen dünnen (15-20  $\mu\text{m}$ ) und kurzen (ca. 1 cm) Seidenfaden ist das Ei nun weit genug von der Oberfläche entfernt (meist die Unterseite von Blättern) um vor Fraßfeinden wie etwa Ameisen geschützt zu sein (Lintz und Scheibel 2013; Smith und Scheibel 2013).

Im Fall der Gattung *Mallada signata* sind im Eierstiel zwei Proteine (MalXB1 (86 kDa) und MalXB2 (55 kDa)) identifiziert worden (Weisman, Okada *et al.* 2009; Bauer und Scheibel 2012). Beide Proteine setzen sich aus einem hoch repetitiven Kern (reich an Serin und Glycin) mit einer Periodizität von 16 Aminosäuren, und kurzen, den Kernbereich flankierenden, nicht repetitiven Termini zusammen (Geddes, Parker *et al.* 1968).

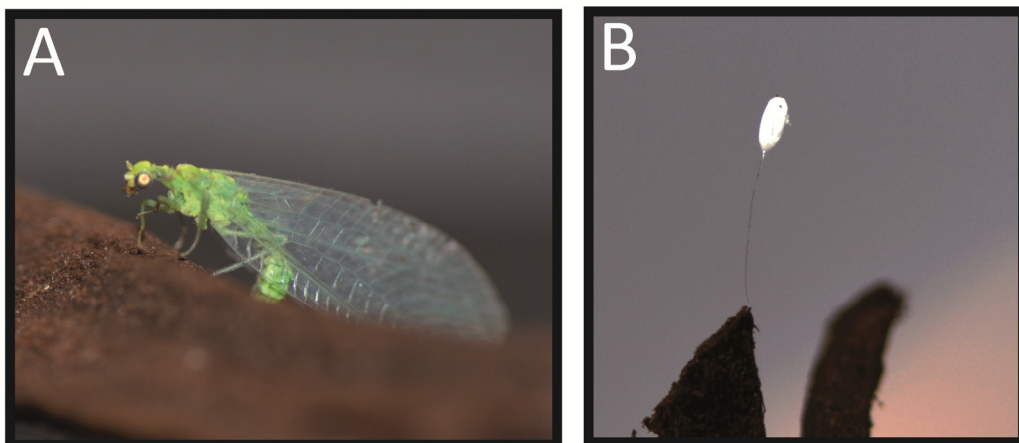
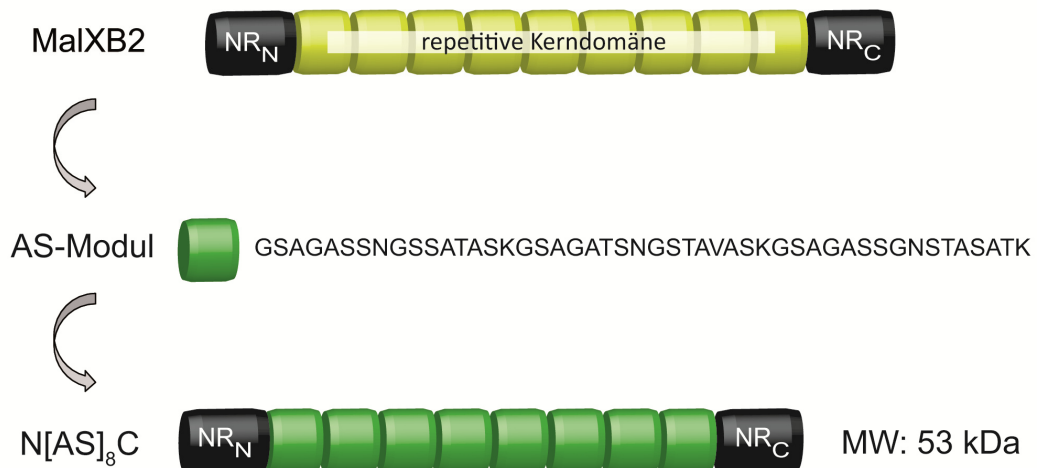


Abbildung 8: Grüne Florfliege (*Chrysoperla carnea*) (A); Seidenstiel mit einem darauf befestigten Ei (B).

Der Eierstiel von Florfliegen war eines der ersten Beispiele von Seiden mit *cross*- $\beta$  Struktur (Geddes, Parker *et al.* 1968). Röntgenbeugungsanalysen zeigten, dass sich die  $\beta$ -Faltblätter zu ca. 2,5 nm großen Kristallen zusammenlagern. Diese Nanokristalle bestehen aus mit  $\beta$ -Schleifen verbundenen acht Aminosäuren langen, antiparallelen  $\beta$ -Strängen (Geddes, Parker *et al.* 1968; Weisman, Okada *et al.* 2009). Durch die Anordnung der  $\beta$ -Faltblätter senkrecht zur Faserachse und deren intra- und intermolekularen Quervernetzung mittels Disulfidbrücken ist eine hohe Biegesteifheit gegeben (Weisman, Okada *et al.* 2009). Des Weiteren wird durch Rekonfigurierung von *cross*- $\beta$  zu parallel ausgerichteten  $\beta$ -Faltblättern unter Dehnung, je nach Luftfeuchtigkeit, eine Dehnbarkeit von bis zu 600% erreicht (Weisman, Okada *et al.* 2009; Bauer, Bertinetti *et al.* 2012). Diese Kombination der mechanischen Besonderheiten eröffnet den Florfliegenseiden eine Vielfalt an Anwendungsmöglichkeiten. Obwohl im Gegensatz zu Spinnen eine großtechnische Züchtung von Florfliegen möglich ist, ist die Gewinnung von Seide trotzdem sehr aufwendig. Um eine ausreichende Menge des Proteins für weitere Studien zu erhalten, wurde ein rekombinantes Eierstiel-Seidenprotein entworfen und hergestellt. Basierend auf dem repetitiven Kernbereich von MalXB2 wurde eine Konsensussequenz aus 48 Aminosäuren (AS-Modul) generiert. Durch Multimerisierung mittels einer nahtlosen Klonierungsstrategie und anschließender Ligation der amino- und carboxyterminalen Domänen wurde ein Gen mit optimierter *codon usage* für eine Expression in *E. coli* generiert und das Protein N[AS]<sub>8</sub>C (MW = 53 kDa) erfolgreich produziert (Abbildung 9) (Bauer und Scheibel 2012). Die aus N[AS]<sub>8</sub>C hergestellten artifiziellen Fasern zeigten bei 30% relativer Luftfeuchtigkeit weitgehend die gleichen mechanischen Eigenschaften wie die natürlichen Vorbilder (Bauer und Scheibel 2012).



**Abbildung 9: Aufbau des rekombinanten Fliegen-Eierstiel-Seidenproteins N[AS]<sub>8</sub>C.** Basierend auf dem repetitiven Kernbereich des Eierstiel-Seidenproteins MalXB2 der Fliege *Mallada signata* wurde eine Konsensussequenz (AS-Modul) abgeleitet. Das so generierte Protein N[AS]<sub>8</sub>C beinhaltet 8 AS-Module sowie beide natürlichen Termini.

## 1.5 INTERAKTIONEN ZWISCHEN BIOMATERIALIEN UND ZELLEN

### 1.5.1 STEUERUNG DER ZELLADHÄSION DURCH SPEZIFISCHE MOTIVE

Die Biokompatibilität eines *scaffolds* steht in engem Zusammenhang mit der Zelladhäsion auf dessen Oberfläche. Die Folge von nicht ausreichender Wechselwirkung zwischen Zellen und Biomaterialien *in vivo* ist deshalb in vielen Fällen die Abstoßung oder Einkapselung des Materials (Leal-Egana, Diaz-Cuenca *et al.* 2013). Interaktion, sowohl zwischen benachbarten Zellen als auch zwischen der Extrazellulären Matrix (ECM) und Zellen, wird durch Zelladhäsionsmoleküle (*cell adhesion molecules*, CAMs) vermittelt. Diese lassen sich in vier Klassen unterteilen: Integrine, Cadherine, Selektine und die Immunoglobulin Familie (Ig-SF) (Hynes 1999; Anselme 2000; van der Flier und Sonnenberg 2001; Duneau, Anderson *et al.* 2006).

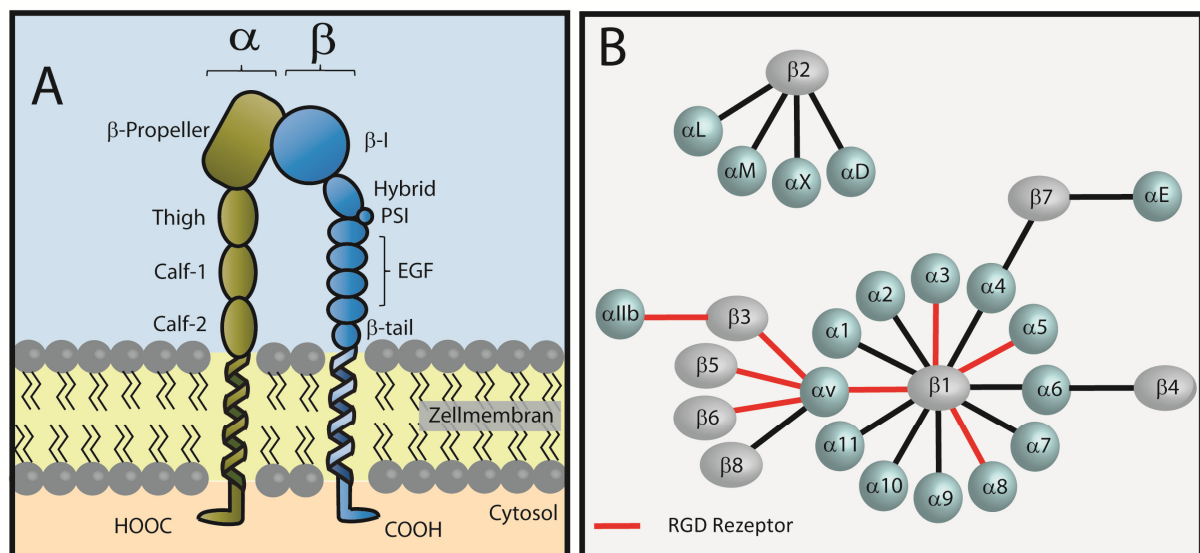
#### 1.5.1.1 INTEGRINE

Integrine verkörpern die vielseitigste und größte Klasse der CAMs und spielen sowohl bei der Zell-Zell als auch bei der Zell-Matrix-Interaktion eine entscheidende Rolle (Luo, Carman *et al.* 2007). Sie verbinden extra- und intrazelluläre Prozesse durch bidirektionale Signalwege. Beim sogenannten *inside-out signaling* wird mittels intrazellulärer

Ligandenbindung die Zelladhäsion, Zellmigration aber auch der Aufbau der extrazellulären Matrix kontrolliert. Durch ECM-Bindung werden Signale ins Innere der Zelle übertragen (*outside-in signaling*). Auf diese Weise werden sowohl Zellpolarität, Proliferation, Genexpression als auch die Struktur des Cytoskeletts gesteuert (Giancotti und Ruoslahti 1999; Hynes 2002; Shattil, Kim *et al.* 2010; Wang, Li *et al.* 2013).

### 1.5.1.1.1 Struktur und natürliche Liganden von Integrinen

Integrine sind transmembrane Zell-Adhäsions-Glykoprotein-Rezeptoren, die aus einem nicht kovalent verbundenen Heterodimer einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit gebildet werden (Ruoslahti und Pierschbacher 1987; Hynes 1999; Luo, Carman *et al.* 2007).



**Abbildung 10: Aufbau der Integrine.** A) Schematische Darstellung der Integrin Struktur in der aktiven Konformation. B) Überblick über die Klasse der Integrine. Durch Kombination aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten können 24 verschiedene Integrine gebildet werden. Die RGD Sequenz erkennenden Integrine sind hier rot markiert. Modifiziert nach Hynes und Askari *et al.* (Hynes 2002; Askari, Buckley *et al.* 2009).

Jede der beiden Untereinheiten durchquert die Zellmembran einmal und besteht aus einer kurzen unstrukturierten cytoplasmatischen Domäne, einer helikalen transmembranen Domäne, sowie einem großen extrazellulären Bereich mit globulärem Kopfstück und langen Stelzenregionen (Abbildung 10 A) (Anselme 2000; Hynes 2002; Shimaoka und Springer 2004; Arnaout, Mahalingam *et al.* 2005; Campbell und Humphries 2011). Der extrazelluläre Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit kann in folgende Bereiche unterteilt werden: eine siebenblättrige  $\beta$ -Propellerdomäne und drei  $\beta$ -sandwich Domänen (*thigh*, *calf-1* und *calf-2*) (Campbell und Humphries 2011). Die Hälfte der  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen zusätzlich eine  $\alpha$ -I Domäne,

während die anderen eine posttranslationale Spaltungsstelle, unweit der Transmembran-Region, aufweisen (Hynes 1992; van der Flier und Sonnenberg 2001; Moser, Legate *et al.* 2009; Campbell und Humphries 2011). Der extrazelluläre Bereich der  $\beta$ -Untereinheit setzt sich aus einer  $\beta$ -I Domäne, eingeschoben in eine Hybrid Domäne, in welche wiederum eine PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin) Domäne eingeschoben ist, zusammen. Diesen drei Domänen folgen vier Cystein-reiche EGF (*epidermal growth factor*) Module, sowie eine  $\beta$ -tail Domäne ( $\beta$ -TD) (Campbell und Humphries 2011). In der  $\alpha$ -I-, der  $\beta$ -Propeller- und der  $\beta$ -I Domäne sind zusätzlich Bindungsstellen für zweiwertige Kationen zu finden, welche die Assoziation der beiden Untereinheiten aber auch die Ligandenbindung beeinflussen (Hynes 1992; Plow, Haas *et al.* 2000; Arnaout, Mahalingam *et al.* 2005; Moser, Legate *et al.* 2009).

Aus Kombination von 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$  Untereinheiten können 24 verschiedene Integrine mit individueller Spezifität für Ligandenbindung und Signaltransduktion gebildet werden (Abbildung 10 B) (Giancotti und Ruoslahti 1999; Hynes 2002; Duneau, Anderson *et al.* 2006; Barczyk, Carracedo *et al.* 2010). Diese 24 Integrine können wiederum in Integrinfamilien unterteilt werden. Die größten Familien sind die  $\beta$ 1 Familie (12 Mitglieder), die  $\alpha$ V Familie (5 Mitglieder) und die  $\beta$ 2 Familie (4 Mitglieder).

Die Ligandenbindung erfolgt mittels des globulären Kopfstückes. Dieses setzt sich aus dem  $\beta$ -Propeller sowie der *thigh* Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta$ -I-, der Hybrid-, sowie der PSI-Domäne der  $\beta$ -Untereinheit zusammen (Askari, Buckley *et al.* 2009). Unter den natürlichen Liganden sind neben Proteinen der extrazellulären Matrix und Zelloberflächenproteinen auch lösliche Integrinliganden, wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (van der Flier und Sonnenberg 2001). Während einige Integrine nur einen Liganden binden, z.B.  $\alpha$ E $\beta$ 7 an E-Cadherin, können die meisten Integrine mit einer Vielzahl an Liganden interagieren. Zudem ist es vielen Liganden möglich an mehrere Integrine zu binden. Trotz dieser Vielfältigkeit kann man Integrin-Ligand Kombinationen in vier Kategorien einteilen: RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) - bindende Integrine ( $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ 8 $\beta$ 1 und  $\alpha$ 11 $\beta$ 3, sowie alle  $\alpha$ V), LDV (Leucin-Aspartat-Valin) - bindende Integrine ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1,  $\alpha$ 4 $\beta$ 7,  $\alpha$ 9 $\beta$ 1, sowie alle  $\beta$ 2),  $\beta$ 1 Integrine mit einer  $\alpha$ -I Domäne ( $\alpha$ 1 $\beta$ 1,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1,  $\alpha$ 10 $\beta$ 1,  $\alpha$ 11 $\beta$ 1) und Laminin-bindende Integrine ohne  $\alpha$ -I Domäne ( $\alpha$ 3 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1,  $\alpha$ 7 $\beta$ 1,  $\alpha$ 6 $\beta$ 4) (Humphries, Byron *et al.* 2006). Eine Auswahl an Integrin-Ligand Kombinationen ist in Tabelle 3 zusammengefasst.



**Tabelle 3: Auswahl an Integrin-Liganden Kombinationen.** Die extrazellulären Liganden lassen sich in drei Gruppen einteilen: unlösliche Proteine der extrazellulären Matrix (z.B. Fibronectin, Kollagen oder Laminin), lösliche Makromoleküle und Proteine auf der Zelloberfläche von benachbarten Zellen (Elangbam, Qualls *et al.* 1997; van der Flier und Sonnenberg 2001; Humphries, Byron *et al.* 2006).

Integrine	Liganden		
	<i>ECM</i>	<i>löslich</i>	<i>Zelloberfläche</i>
<b>RGD - bindende Integrine</b>	$\alpha 5 \beta 1$	Fibronectin	tTG; Endostatin
	$\alpha 8 \beta 1$	Fibronectin; Tenascin; Nephronectin	TGF- $\beta$ -1-LAP
	$\alpha v \beta 1$	Fibronectin; Vitronectin; vWF	TGF- $\beta$ -1-LAP
	$\alpha IIb \beta 3$	Fibronectin; Vitronectin	Fibrinogen; Cyr61;
	$\alpha v \beta 3$	Fibronectin; Vitronectin; vWF; Osteopontin; Tenascin; BSP; Tsp-1	Fibrinogen; Cyr61; MMP-2; Endostatin; Angiostatin; Tumstatin
	$\alpha v \beta 5$	Vitronectin; BSP	TGF- $\beta$ -1-LAP; Cyr61; Endostatin
	$\alpha v \beta 6$	Fibronectin; Tenascin	TGF- $\beta$ -1-LAP
	$\alpha v \beta 8$	Kollagen; Laminin; Fibronectin	
<b>LDV - bindende Integrine</b>	$\alpha 4 \beta 1$	Fibronectin; Osteopontin	tTG; Angiostatin    VCAM-1
	$\alpha 9 \beta 1$	Osteopontin; Tenascin; Kollagen; Laminin	tTG; Angiostatin    VCAM-1
	$\alpha D \beta 2$		ICAM-3; VCAM-1
	$\alpha L \beta 2$		ICAM-1-5
	$\alpha M \beta 2$		Fibrinogen; iC3b; FX    ICAM-1; VCAM-1
	$\alpha X \beta 2$		Fibrinogen; iC3b
	$\alpha 4 \beta 7$	Fibronectin	VCAM-1; MAdCAM
	$\alpha E \beta 7$		E-Cadherin
<b><math>\beta 1</math> Integrine mit einer <math>\alpha</math>-I Domäne</b>	$\alpha 1 \beta 1$	Kollagen; Laminin	
	$\alpha 2 \beta 1$	Kollagen; Laminin;	MMP-1
	$\alpha 10 \beta 1$	Kollagen	
	$\alpha 11 \beta 1$	Kollagen	
<b>Laminin - bindende Integrine ohne <math>\alpha</math>-I Domäne</b>	$\alpha 3 \beta 1$	Laminin; Thrombospondin	Cyr61
	$\alpha 6 \beta 1$	Laminin	
	$\alpha 7 \beta 1$	Laminin	
	$\alpha 6 \beta 4$	Laminin	

Abkürzungen: BSP = *bone sialo protein*; Cyr61 = *cysteine-rich angiogenic protein 61*; FX = Gerinnungsfaktor X; ICAM = *intercellular adhesion molecule*; iC3b = *inactive complement factor 3b*; LAP = *latency associated peptide*; MAdCAM = *mucosal addressin cell adhesion molecule*; MMP = *matrix metalloproteinase*; TGF- $\beta$  = *transforming growth factor*  $\beta$ ; tTG = *tissue transglutaminase*; VCAM = *vascular cell adhesion molecule*, vWF = *von-Willebrand-Faktor*.

Die Möglichkeit, die Liganden-Bindungsaffinität schnell und reversibel zu ändern, ist eine weitere zentrale Eigenschaft der Integrine (Arnaout, Mahalingam *et al.* 2005). Von enormer Bedeutung ist dies z.B. für das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ , welches auf der Zelloberfläche von im Blut zirkulierenden Thrombozyten vorkommt. Durch Inaktivierung wird das Binden des Hauptliganden (Fibrinogen) und somit Thrombozyten-Aggregation und Thrombus-Bildung verhindert (Hynes 2002; Moser, Legate *et al.* 2009).

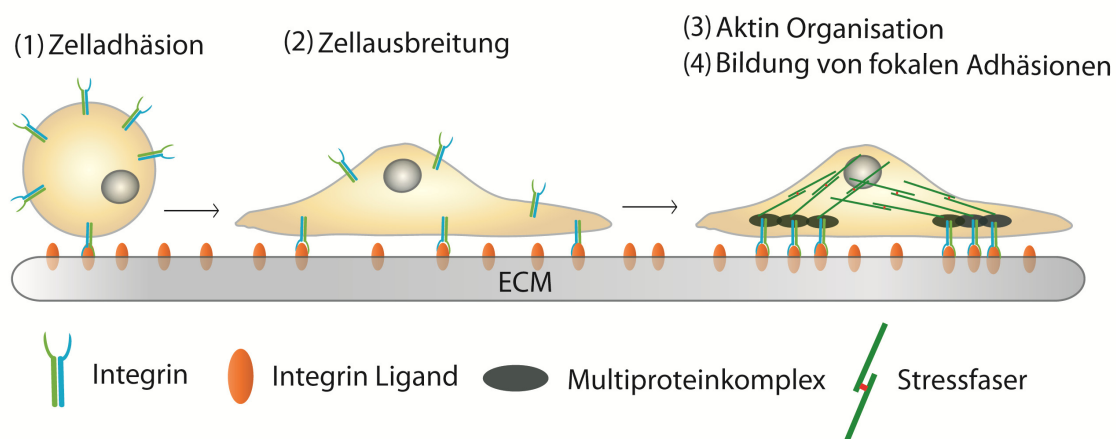
Grundsätzlich können Integrine drei verschiedene Konformationen mit jeweils unterschiedlicher Affinität annehmen: Eine gebogene Konformation mit niedriger Affinität, eine ausgestreckte Konformation mit offenem Kopfstück und hoher Affinität, sowie eine ausgestreckte Konformation mit geschlossenem Kopfstück und mittlerer Aktivität (Takagi, Petre *et al.* 2002; Shimaoka und Springer 2004; Xiao, Takagi *et al.* 2004; Duneau, Anderson *et al.* 2006; Luo, Carman *et al.* 2007). Die Transmembran-Domäne und die cytoplasmatischen Domänen sind in der gebogenen Konformation eng miteinander verbunden, wohingegen die Separation der beiden Domänen und die Trennung des globulären Kopfstückes von der Stelzenregion zu einer ausgestreckten Konformation mit hoher Affinität führt. (Xiao, Takagi *et al.* 2004; Luo, Carman *et al.* 2007; Askari, Buckley *et al.* 2009).

#### 1.5.1.1.2 Zelladhäsion

Integrin vermittelte Zelladhäsion kann in vier Schritte unterteilt werden: Zellanhaftung, Zellausbreitung, Organisation des Cytoskeletts und das Ausbilden von fokalen Adhäsionen (Abbildung 11) (Lebaron und Athanasiou 2000; van der Flier und Sonnenberg 2001; Schaffner und Dard 2003).

Als erstes bindet die Zelle über physikalische Wechselwirkungen an das Substrat. Dadurch ist sie in der Lage leichten Scherkräften zu widerstehen. Um die Anzahl der Substratkontakte zu erhöhen, beginnt die Zelle als nächstes den Zellkörper abzuflachen und die Membran spreitet über die Oberfläche (Lebaron und Athanasiou 2000; Blystone 2004). Durch Bindung an die Extrazelluläre Matrix wird ein *clustern* der Integrine sowie die Bindung verschiedener Adapterproteine induziert (Lebaron und Athanasiou 2000). Diese cytoplasmatischen Adapterproteine können auf Basis ihrer Funktion in drei Gruppen eingeteilt werden: 1) Proteine, die mit dem Cytoskelett verbunden sind und der Verankerung der Integrine mit dem Cytoskelett dienen (z.B.  $\alpha$ -Aktinin, Talin und Filamin);

2) Signalmoleküle, welche verschiedene Kinasen wie die Fokalahäsionskinase (FAK) beinhalten; 3) Calcium bindende Proteine, welche vermutlich bei der Integrin-Aktivierung eine Rolle spielen, sowie Chaperone, die bei der korrekten Faltung der Integrine helfen (van der Flier und Sonnenberg 2001; Alberts, Johnson *et al.* 2011). Die Bindung von Adapterproteinen und *clustern* der Integrine führen zu einer Reorganisation der Aktin Filamente in größere Stressfasern, deren Bildung wiederum das *clustern* der Integrine und somit die Verstärkung der ECM Bindung begünstigt (positive Feedback Kopplung). Das Ergebnis sind Aggregate aus Cytoskelettproteinen, Integrinen und ECM Proteinen, die auch als fokale Adhäsionen bekannt sind (Giancotti und Ruoslahti 1999; van der Flier und Sonnenberg 2001)



**Abbildung 11: Schematische Darstellung Integrin-vermittelter Zelladhäsion.** Diese kann in vier Hauptschritte unterteilt werden: Zellanhaftung (1), Zellausbreitung (2), Organisation des Zytoskeletts (3) und das Ausbilden von fokalen Adhäsionen (4).

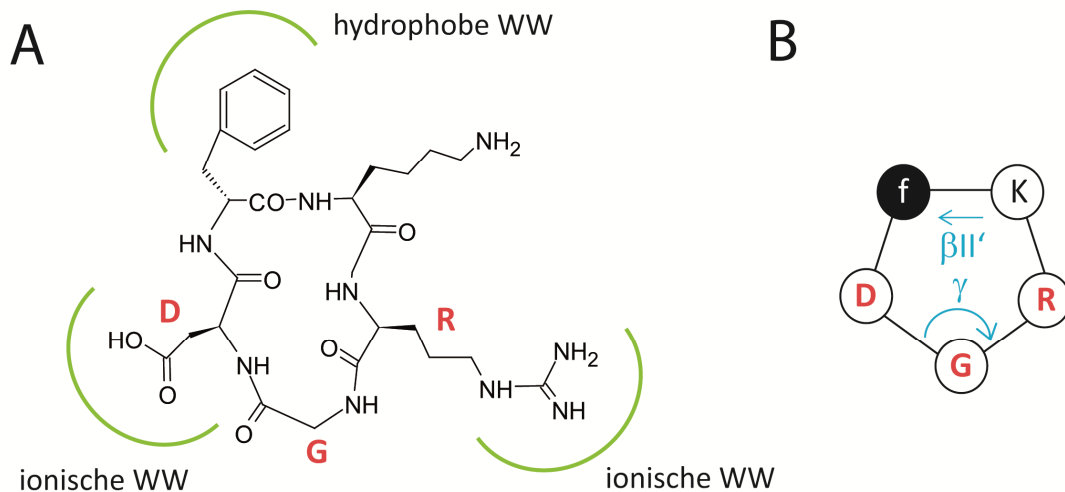
#### 1.5.1.1.3 Die RGD-Sequenz

Das Tripeptid RGD als minimales Erkennungsmotiv für Integrine wurde 1984 von Pierschbacher und Ruoslahti in Fibronektin identifiziert (Pierschbacher und Ruoslahti 1984). Kurze Zeit später stellte sich heraus, dass viele andere Adhäsionsproteine, wie z.B. Fibrinogen, Vitronectin, Tenascin und Osteopontin ebenfalls diese Erkennungssequenz aufweisen (Pierschbacher und Ruoslahti 1984; Gartner und Bennett 1985; Plow, Pierschbacher *et al.* 1985; Suzuki, Oldberg *et al.* 1985; Ruoslahti 1996). Neben dem Tripeptid RGD sind inzwischen weitere die Zelladhäsion fördernde minimale Erkennungssequenzen (z.B. LDV, KGD, YIGSR, REDV, KHSR) bekannt (Plow, Pierschbacher *et al.* 1985; Hubbell,

Massia *et al.* 1991; Ranieri, Bellamkonda *et al.* 1995; Ruoslahti 1996; Dee, Andersen *et al.* 1998; Shin, Jo *et al.* 2003). Trotzdem bleibt die am meisten erforschte und eingesetzte Zelladhäsionssequenz das RGD-Peptid.

Obwohl 8 von 24 Integrinen RGD erkennen, sind sie trotzdem in der Lage zwischen verschiedenen Liganden mit derselben Erkennungssequenz zu unterscheiden (Abbildung 10 B) (Ruoslahti 1996; Barczyk, Carracedo *et al.* 2010; Mas-Moruno, Rechenmacher *et al.* 2010). Diese RGD-reaktiven Integrine beinhalten alle eine posttranslational gespaltene  $\alpha$ -Untereinheit ohne  $\alpha$ -I Domäne (Hynes 1992). Sie binden RGD an der Grenzfläche zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit am Kopfstück, wobei das Aspartat ein Kation in der  $\beta$ -I Domäne koordiniert und Arginin mit der  $\beta$ -Propellerdomäne der  $\alpha$ -Untereinheit wechselwirkt (Humphries, Byron *et al.* 2006).

Durch Imitierung der Adhäsionsproteine auf zwei verschiedene Arten sind die Anwendungsbereiche für RGD-Peptide vielfältig. Auf der Oberfläche immobilisiertes RGD fungiert als Agonist der ECM und fördert Zelladhäsion. Im Gegensatz dazu wirken RGD-Peptide in Lösung als Antagonisten, was zu einer Ablösung der Zellen führt (Ruoslahti 1996; Hersel, Dahmen *et al.* 2003). Wird allerdings die minimale Erkennungssequenz RGD aus dem Kontext des Proteins genommen, leidet darunter meist die Affinität und Spezifität (Hersel, Dahmen *et al.* 2003). Da jeder Zelltyp sein individuelles Integrin Expressionsmuster aufweist, muss durch Design der Peptide die Selektivität gegenüber einzelnen Integrinen erhöht werden, um gezielte Zellantworten in komplexen Umgebungen (z.B. *in vivo*) zu erreichen. (Healy 1999; Hynes 2002; Schaffner und Dard 2003). Dies spielt im Fall von *scaffolds* für Gefäßersatz auf denen die Adhäsion von Endothelzellen erwünscht ist, wohingegen die Adhäsion von Thrombozyten verhindert werden soll, eine große Rolle. Aber auch für Implantatbeschichtungen bei der Knochenregeneration, auf denen Osteoblasten-, aber keine Thrombozyten Adhäsion erwünscht ist, ist die Selektivität von RGD-Peptiden von Bedeutung (Tang, Kligman *et al.* 2009).



**Abbildung 12: Design von synthetischen RGD-Peptiden.** (A) Integrine erkennen RGD-Peptide durch die Triade der Seitenketten des Arginins, des Aspartats sowie des Phenylalanins und den damit verbundenen hydrophoben und ionischen Wechselwirkungen (WW). Die Selektivität wird durch den Abstand der Seitenketten zueinander bestimmt. (B) Durch Zyklisierung wird die Flexibilität der Konformation eingeschränkt und so die Selektivität erhöht. Modifiziert nach Dunehoo *et al.*, Heckmann und Kessler sowie Mas-Moruno *et al.* (Dunehoo, Anderson *et al.* 2006; Heckmann und Kessler 2007; Mas-Moruno, Rechenmacher *et al.* 2010).

Die Spezifität der RGD-Peptide hängt von der Konformation des Peptidrückgrats, der Orientierung der geladenen Aminosäuren (Arginin und Aspartat) und den benachbarten hydrophoben Resten ab (Schaffner und Dard 2003) (Abbildung 12). Im Gegensatz zu linearen RGD-Sequenzen, welche flexibel verschiedene Konformationen einnehmen können und allgemein an diverse Integrine binden, kann durch Zyklisierung und somit Versteifung der Struktur die Selektivität erhöht werden (Dunehoo, Anderson *et al.* 2006; Heckmann und Kessler 2007; Mas-Moruno, Rechenmacher *et al.* 2010). Durch zusätzliches Einfügen von D-Aminosäuren werden charakteristische *turn* Motive ( $\beta_{II'}$ ) induziert und die Flexibilität der Konformation zudem weiter eingeschränkt (Gurrath, Muller *et al.* 1992; Heckmann und Kessler 2007). Zyklopentapeptide wie z.B. c(RGDfK) (Abbildung 12 B), in denen das RGD Motiv in einer geknickten Form vorliegt, sind selektiv für das Integrin  $\alpha V\beta 3$ , wohingegen Zyklohexapeptide mit gestrecktem Peptidrückgrat selektiv für das Integrin  $\alpha IIb\beta 3$  sind. Entscheidend dafür ist dabei der Abstand zwischen den Seitenketten von Aspartat und Arginin (Heckmann und Kessler 2007; Mas-Moruno, Rechenmacher *et al.* 2010).

## **1.5.2 STEUERUNG DER ZELLADHÄSION DURCH UNSPEZIFISCHE INTERAKTIONEN**

### **1.5.2.1 PROTEIN-BIOMATERIAL WECHSELWIRKUNGEN**

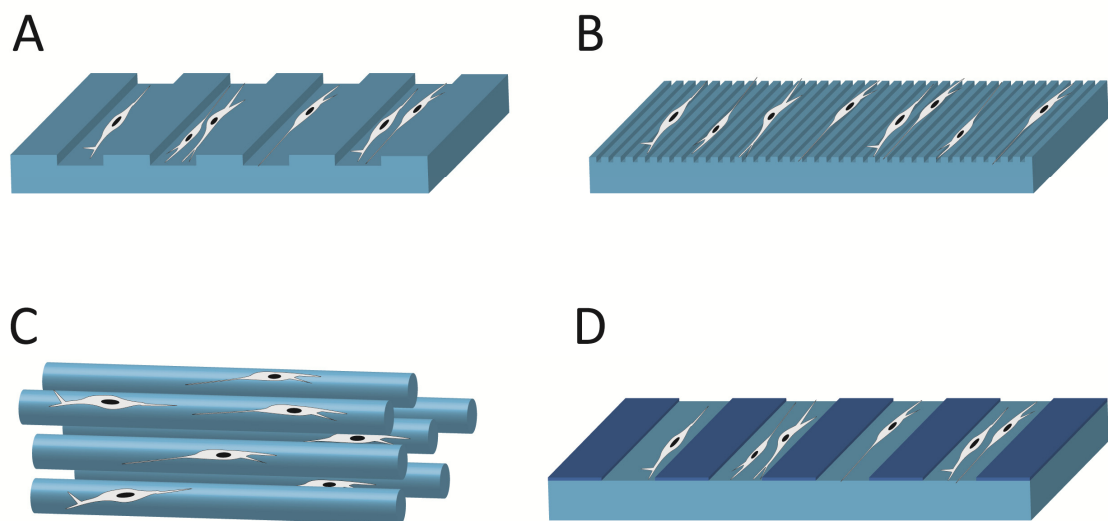
Neben der Möglichkeit durch Einführung spezifischer Peptide die Interaktionen zwischen Zellen und Biomaterialien zu verbessern, kann Zelladhäsion auch durch auf der Materialoberfläche unspezifisch adsorbierte Proteine vermittelt werden (Roach, Eglin *et al.* 2007; Leal-Egana, Diaz-Cuenca *et al.* 2013). Welche und in welchem Maß Proteine auf der Oberfläche adsorbieren wird unter anderem durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Materialoberfläche beeinflusst, wodurch Proteinadsorption entweder gemindert oder gefördert wird. Da viele ECM-Proteine aber auch die Zellmembran bei physiologischem pH-Wert negativ geladen sind, ist im Allgemeinen auf positiv geladenen Biomaterialien eine verbesserte Zelladhäsion zu beobachten (Healy, Thomas *et al.* 1996; Szabo, Brutsche *et al.* 1999; Anselme 2000; Kim, Kim *et al.* 2012; Leal-Egana, Diaz-Cuenca *et al.* 2013).

Ein weiterer wichtiger Faktor sowohl bezüglich Proteinadsorption aber auch Zelladhäsion ist die Benetzbarkeit/Hydrophobizität der Oberfläche. Generell ist die Proteinadsorption auf hydrophoben Substraten gegenüber hydrophilen Materialoberflächen begünstigt (Muller, Luders *et al.* 2010). In Folge der Maximierung von hydrophoben Wechselwirkungen kommt es bezüglich Proteinadsorption auf stark hydrophoben Oberflächen zu einer veränderten Konformation der Proteine und damit vermutlich zu veränderten Zugänglichkeiten von z.B. Zelladhäsionsmotiven (Hlady und Buijs 1996; Lensen, Schulte *et al.* 2008). Deshalb ist die maximale Zelladhäsion diverser Zelltypen auf Oberflächen mit Hydrophobizität mittlerer Größenordnung (Wasserkontaktwinkel ca. 55°) zu beobachten (Ruardy, Schakenraad *et al.* 1995; Lee, Khang *et al.* 1998; Anselme 2000; Lensen, Schulte *et al.* 2008). Durch gezielte Steuerung dieser beiden Kräfte können so gezielt Oberflächen hergestellt werden, welche entweder Zelladhäsion verhindern oder fördern.

### **1.5.2.2 OPTIMIERTE OBERFLÄCHENTOPOGRAPHIE**

In engem Zusammenhang mit der Benetzbarkeit der Oberfläche steht deren Rauigkeit/Topographie. Harrison erkannte bereits 1911 die Bedeutung der Oberflächentopographie für Zelladhäsion (Harrison 1911). Er kultivierte verschiedene Zelltypen auf Spinnennetzen und stellte einen Einfluss der Oberflächenstruktur auf

Migration, Morphologie und Ausrichtung adhärenter Zellen fest (Harrison 1911; Meyle, Wolburg *et al.* 1993). Um diese Orientierung von Zellen entlang von Fasern zu beschreiben, prägte Weiss später den Begriff der Kontaktführung (*contact guidance*), welcher bis heute verwendet wird, um allgemein den natürlichen Mechanismus zu beschreiben, bei dem Zellen auf Strukturen im Mikrometer- und Submikrometerbereich reagieren (Weiss 1929; Weiss 1934; Weiss 1945; Bettinger, Langer *et al.* 2009). Verschiedene Analysen belegten außerdem, dass Zelladhäsion durch diverse topologische Eigenschaften beeinflusst und signifikant verbessert werden kann (Polanski, Freed *et al.* 1983; Meyle, Wolburg *et al.* 1993; Chen, Weng *et al.* 2012; Leal-Egana, Lang *et al.* 2012).



**Abbildung 13: Übersicht über verschiedene Substrate zur gezielten Anordnung diverser Zelltypen durch definierte anisotrope topographische (A-C) oder physikochemische (D) Eigenschaften.** A) Mikrostrukturierte Oberflächen, hergestellt u. a. durch *soft-Lithographie* oder Photolithographie. B) Nanostrukturierte Substrate, produziert z.B. mittels Elektronenstrahl-lithographie. C) Ausgerichtete Fasern, hergestellt z.B. durch Elektrospinning. D) Mittels *microcontact printing* oder Photolithographie hergestellte, chemisch unterschiedliche Oberflächenmuster. Modifiziert nach Bettinger *et al.* und Hoffman-Kim *et al.* (Bettinger, Langer *et al.* 2009; Hoffman-Kim, Mitchel *et al.* 2010).

Während die ersten topographischen Untersuchungen auf biologischen Materialien durchgeführt wurden, können mittlerweile durch verschiedene Oberflächentechniken definierte physikochemische und topographische anisotrope Substrate produziert werden (Harrison 1911; Meyle, Wolburg *et al.* 1993; Anselme und Biggerelle 2011). Eine gestreckte Ausrichtung der Zellen kann dabei auf Systemen mit topographischen Strukturen im Mikrometer- und Nanometerbereich sowohl mit als auch ohne Fernordnung erreicht werden (Meyle, Gultig *et al.* 1995; Wojciak-Stothard, Curtis *et al.* 1996; Teixeira, Abrams *et al.* 2003;

Fraser, Ting *et al.* 2008; Anselme und Biggerelle 2011; Jeffries und Wang 2013) (Abbildung 13). Ein umfassender Überblick über den Einfluss unterschiedlicher Herstellungsverfahren, Materialien, Größenordnungen und Art der Strukturen auf das Verhalten verschiedener Zelltypen ist in Flemming *et al.* aber auch in Anselme und Biggerelle zu finden (Flemming, Murphy *et al.* 1999; Anselme und Biggerelle 2011). Eine zusätzliche Möglichkeit Adhäsion, Orientierung und Morphologie von Zellen zu beeinflussen, ist die Verwendung von Substraten mit chemisch unterschiedlichen Oberflächenmustern (Abbildung 13D) (Britland, Clark *et al.* 1992; Clark, Connolly *et al.* 1992). Durch Aufbringen z.B von ECM-Proteinen, werden Substrate mit definierten zelladhäsiven Bereichen generiert, was je nach hergestelltem Muster wiederum zu einer Ausrichtung der Zellen gestreckt entlang der Achse führt (Saneinejad und Shoichet 1998).



## 2 ZIELSETZUNG

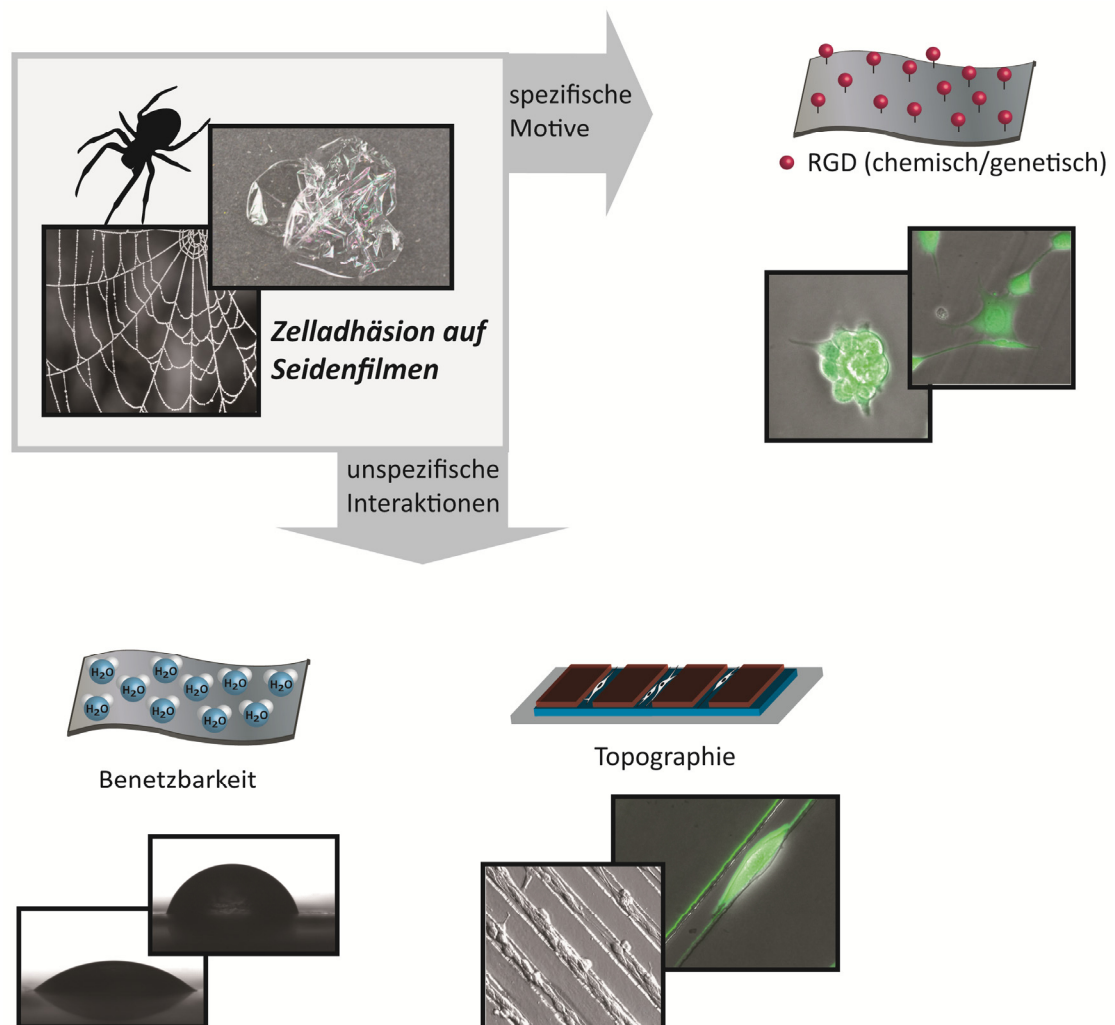
Spinnenseide ist aufgrund ihrer Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und den außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften ein vielseitiges Material für unterschiedlichste Applikationen. Durch rekombinante Herstellung sind Spinnenseidenproteine in gleichbleibender Qualität und ausreichenden Mengen verfügbar und können in unterschiedliche Morphologien überführt werden.

Filme aus dem von der *Dragline*-Seide der Gartenkreuzspinne (*A. diadematus*) abgeleiteten Protein eADF4(C16) zeichnen sich durch eine geringe Zelladhäsion sowie Proliferation aus und sind deshalb nur für bestimmte biomedizinische Anwendungen (z.B. Beschichtung von Silikonbrustimplantaten) geeignet. In vielen Fällen aber ist eine ausreichende Wechselwirkung zwischen Zellen und Implantat essentiell, um eine Einkapselung oder Abstoßung des Materials zu vermeiden. Deshalb sollte in dieser Arbeit eine Steuerung der Zelladhäsion entweder durch Einführung spezifischer Motive oder unspezifischer Interaktionen (Topographie oder Benetzbarkeit) ermöglicht werden. Eine vielversprechende Methode ist die Änderung der chemischen Zusammensetzung zum Beispiel durch Einführung von spezifischen Zelladhäsionspeptiden. Zum einen sollte deshalb durch molekularbiologische Methoden eine RGD Sequenz in eADF4(C16) eingeführt werden. Diese Modifikation des Proteins hat den Vorteil, dass die hergestellte Variante direkt nach der Reinigung einsetzbar ist. Da diese Methode allerdings auf lineare RGD Sequenzen beschränkt ist, cyclische RGD-Peptide aber eine höhere Affinität und Selektivität aufweisen, sollte zum anderen die Cystein enthaltende Variante (ntag<sup>Cys</sup>C16) mit dem cyclischen Peptid c(RGDfK) chemisch funktionalisiert werden. Nach Modifizierung und Filmherstellung sollten eventuelle Einflüsse der Funktionalisierung auf Assemblierungsverhalten, Struktur, Benetzbarkeit oder Rauigkeit untersucht werden. Des Weiteren sollte die Effizienz der eingeführten linearen und cyclischen RGD Sequenzen durch *in vitro* Zellkulturanalysen mit Fibroblasten analysiert werden. Da *in vivo* die Anordnung, Form und Ausrichtung der Zellen oftmals auch deren Funktion bestimmt, sollten auf Seidenfilmen topographische Strukturen im Mikrometer Bereich eingeführt werden. Aufgrund der Tatsache, dass Oberflächenstrukturen alleine die Interaktion zwischen Zellen und Biomaterialien entscheidend verbessern können, sollten neben den RGD-modifizierten auch strukturierte

unmodifizierte eADF4(C16) Seidenfilme hergestellt und ihr Einfluss auf die Adhäsion und Ausrichtung diverser Zelllinien analysiert werden. Da neben biochemischen Signalen und Topographie auch die Hydrophobizität der Oberfläche die Zelladhäsion beeinflusst, sollten eADF4(C16) Filme mit unterschiedlicher Benetzbarkeit hergestellt und im Weiteren charakterisiert werden.

### 3 SYNOPSIS

Die vorliegende Arbeit beinhaltet vier Publikationen, die in Kapitel 7 dargestellt sind. Deren gemeinsame Thematik ist die Steuerung der Zelladhäsion auf Spinnenseidenfilmen entweder durch chemische oder physikalische Modifikationen (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Verschiedene Möglichkeiten zur Verbesserung der Zelladhäsion auf Seidenfilmen.** Dies kann entweder mittels Einführung spezifischer Motive (z.B. RGD) oder durch gezielte Steuerung unspezifischer Interaktionen (z.B. über Topographie/Benetzbarkeit) zwischen Zellen und Materialoberfläche erfolgen.

Aufgrund der hervorragenden Biokompatibilität von Spinnenseide konnte das rekombinante Spinnenseidenprotein eADF4(C16) bereits erfolgreich als Beschichtung von Silikonbrustimplantaten eingesetzt werden. Hierbei wurde die Bildung von Kapselfibrose und Entzündungen, unter anderem durch eine verminderte Interaktion zwischen Zellen und

Seidenbeschichtung, signifikant reduziert (Zeplin, Maksimovikj *et al.* 2014). Dennoch ist in den meisten Fällen eine ausreichende Wechselwirkung von Zellen mit Biomaterialien für einen erfolgreichen Einsatz des Implantats essentiell. Generell wird Zelladhäsion sowohl durch spezifische Motive als auch durch unspezifische Interaktionen vermittelt (Hersel, Dahmen *et al.* 2003; Leal-Egana, Lang *et al.* 2012). Als erstes wurde daher in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kessler (TU München) die chemische Zusammensetzung der eADF4(C16) Seidenfilme durch Einführung von RGD (Arginin – Glycin – Aspartat) Zelladhäsionspeptiden verändert (Teilarbeit I, Kapitel 7). Dabei zeigten Fibroblasten im Vergleich zu unmodifizierten eADF4(C16) Filmen auf funktionalisierten Spinnenseidenfilmen durch die spezifische Interaktion mit RGD Motiven eine signifikant verbesserte Adhäsion und infolge dessen eine schnellere Proliferation.

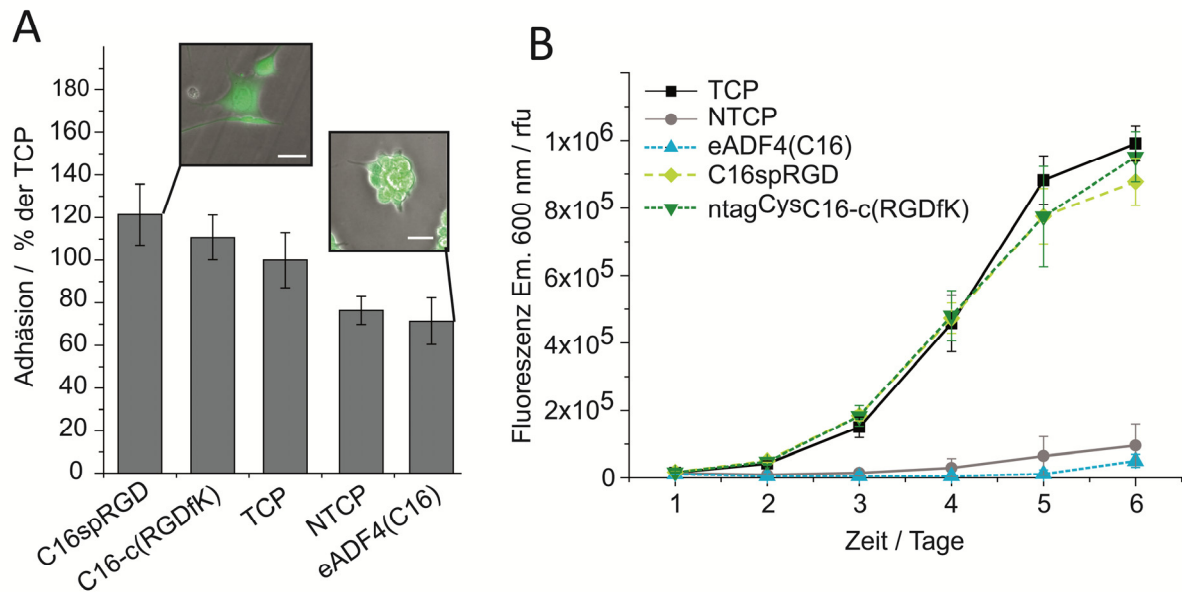
Ziel des zweiten Teils der Dissertation war es, unspezifische Interaktionen zwischen Zellen und Seidenbeschichtungen zu steuern. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Einbringen einer Oberflächenstruktur z.B. mittels Elektrosponning, die Verankerung von Fibroblasten auf zweidimensionalen Seidenoberflächen verbessert wird (Leal-Egana, Lang *et al.* 2012). Da aber des Weiteren auch Form und Ausrichtung der Zellen auf *scaffolds* entscheidend für deren Funktion sind (Torbet, Malbouyres *et al.* 2007; Lawrence, Marchant *et al.* 2009; Gil, Park *et al.* 2010), wurden mittels Mikroabformung in Kapillaren (*micro-molding in capillaries*, MIMC) (Xia, Kim *et al.* 1996) Oberflächen mit definierten Mustern aus zwei verschiedenen rekombinanten Seidenproteinen hergestellt. Durch die Kombination von Spinnenseide und Florfliegen-seide konnte gesteuert werden an welchen Stellen Zellen adhären und proliferieren (Teilarbeit II, Kapitel 7). Neben dem Einfluss der Oberflächenstrukturierung auf die Zelladhäsion, konnte auch gezeigt werden, dass die Benetzbarkeit von Spinnenseidenfilmen durch Auswahl spezifischer Grenzflächen (Seidenprotein-Oberfläche) individuell eingestellt werden kann (Teilarbeit III, Kapitel 7). In Zukunft ist es damit möglich den Einfluss der Hydrophobizität auf Zelladhäsion anhand eines Materials mit identischer chemischer Zusammensetzung zu analysieren.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse und Schlussfolgerungen der unterschiedlichen Publikationen kurz dargestellt und diskutiert. Weitere detaillierte Informationen über alle Experimente sind in den jeweiligen Publikationen zu finden (Kapitel 7).

### 3.1 RGD-MODIFIZIERTE SPINNENSEIDENFILME

Eine vielversprechende Methode um die Interaktion zwischen Zellen und Biomaterialien zu verbessern ist die Einführung von Zelladhäsionspeptiden. Die minimale Erkennungssequenz für Integrine RGD (Arginin-Glycin-Aspartat) wurde bereits auf diversen Träger Oberflächen, verschiedene Metalle (z.B. Titan und Titanlegierungen), synthetische Polymere (z.B. Polymethylmethacrylat) aber auch natürliche Materialien (z.B. Seide) immobilisiert (Hern und Hubbell 1998; Kantlehner, Schaffner *et al.* 2000; Sofia, McCarthy *et al.* 2001; Schaffner und Dard 2003; Auernheimer, Zukowski *et al.* 2005; Morgan, Roskov *et al.* 2008; Mas-Moruno, Dorfner *et al.* 2013; Widhe, Johansson *et al.* 2013). In dieser Arbeit wurde mittels molekularbiologischer Methoden eine lineare RGD Sequenz (GRGDSPG) in das Spinnenseidenprotein eADF4(C16) eingeführt. Da bekannt ist, dass cyclische RGD Peptide eine höhere Affinität und Selektivität als lineare aufweisen, wurde zusätzlich die Cystein enthaltende Variante ntag<sup>Cys</sup>C16 mit dem cyclischen Peptid (cRGDfK) chemisch modifiziert (Teilarbeit I, Abbildung 1). Um eventuelle Einflüsse der Modifikation auf Struktur, Benetzbarkeit oder Assemblierungsverhalten der Proteine zu analysieren, wurden die prozessierten Filme mittels Fouriertransformierter Infrarot (FTIR)-Spektroskopie, Rasterkraftmikroskopie (AFM, *Atomic Force Microscopy*) und Kontaktwinkelmessungen analysiert (Teilarbeit I, Abbildung 4 sowie Tabelle 2). Die Seidenfilme zeigten dabei bezüglich Sekundärstruktur und Rauigkeit vernachlässigbar kleine Unterschiede. Die Wasserkontaktwinkel der modifizierten und unmodifizierten Filme liegen mit Werten um die 60° in einem optimalen Bereich für eine Kultivierung von Fibroblasten (Tamada und Ikada 1994).

Um erste Anhaltspunkte bezüglich Interaktion zwischen Zellen und Spinnenseidenfilmen zu erhalten, wurden Adhäsionstests mit BALB/3T3 Fibroblasten auf diversen Seidenfilmen durchgeführt (Abbildung 15 A sowie Teilarbeit I, Abbildung 5). Die Zelladhäsion auf eADF4(C16) Filmen ist vergleichbar mit der auf unbehandelten Zellkulturplatten (*non-treated cell culture plates*, NTCP). Da in eADF4(C16) Filmen keine Adhäsionsmotive vorhanden sind, sind hier vor allem die physikochemischen Eigenschaften des Films entscheidend. Die geringe Adhäsion auf eADF4(C16) Filmen ist deshalb durch die geringe Rauigkeit (Teilarbeit I, Tabelle 2) der Filmoberfläche und die damit verbundene Verhinderung von physikalischen Verankerungen der Fibroblasten zu erklären.



**Abbildung 15: Analyse der Interaktion von BALB/3T3 Fibroblasten mit Spinnenseidenfilmen.** A) Auf behandelte Zellkulturplatten (TCP) normierte Adhäsion auf unmodifizierten (eADF4(C16)), sowie genetisch modifizierten (C16spRGD) und chemisch modifizierten (ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) Seidenfilmen. Die Morphologie der Zellen bestätigt die Analyse. Fibroblasten auf eADF4(C16) Filmen zeigen eine abgerundete Morphologie und bilden durch Zell-Zell Interaktionen *Cluster* aus. Im Gegensatz dazu haben Fibroblasten auf beiden RGD-modifizierten Filmen eine ausgebreitete, flache Zellmorphologie (vgl. auch Teilarbeit I, Abbildung 7). Größenstandart: 25 µm. B) Proliferation von BALB/3T3 Fibroblasten auf Seidenfilmen und Kontrolloberflächen. (Wohlrab, Mueller *et al.* 2012). Modifiziert nach *Biomaterials* **2012**, 33(28): 6650-6659 mit freundlicher Genehmigung des Verlages Elsevier.

Im Gegensatz dazu zeigten Fibroblasten auf RGD-modifizierten Seidenfilmen eine signifikant höhere Zelladhäsion, die mit behandelten Zellkulturplatten (*treated cell culture plates*, TCP) vergleichbar ist. Interessanterweise war die Zellbindungsaktivität der linearen RGD- Sequenz (genetisch modifiziert) nicht von der des Cyclopeptids (chemisch gekoppelt) zu unterscheiden. Eine mögliche Erklärung liefern wahrscheinlich die individuellen Expressionsmuster von Integrinen und der damit verbundenen Affinität gegenüber diversen RGD-Peptiden in verschiedenen Zelltypen. So haben beide hier verwendeten Peptide ähnliche Selektivität gegenüber  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin (Kantlehner, Schaffner *et al.* 2000; Hersel, Dahmen *et al.* 2003). Des Weiteren kann es aber aufgrund der Produktion von ECM Proteinen (Kollagen Typ I und Fibronektin) durch Zellen auch möglich sein, dass Unterschiede zwischen den beiden Peptiden nur in den Anfangsstadien der Zelladhäsion zu sehen sind.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Proliferation der Zellen auf Materialoberflächen. Im Gegensatz zu eADF4(C16) Filmen zeigten auf RGD-modifizierten Seidenfilmen kultivierte

Fibroblasten exponentielles Wachstum und mit behandelten Zellkulturplatten vergleichbare Proliferationsraten und Verdopplungszeiten, unabhängig von linearer und zyklischer Modifikation (Abbildung 15, Teilarbeit I, Abbildung 6 sowie Tabelle 3).

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits eine Thiolgruppendichte von  $185 \text{ fmol/cm}^2$  auf ntag<sup>Cys</sup>C16 Filmen bestimmt werden. Angenommen, dass im Fall einer RGD-Kopplung an das Cystein eine ähnliche Zugänglichkeit vorhanden ist, liegen die Seidenfilme damit in einem für eine effiziente Zelladhäsion optimalen Bereich (Massia und Hubbell 1991; Hersel, Dahmen *et al.* 2003; Spiess, Wohlrab *et al.* 2010).

RGD-modifizierte Seidenfilme stellen somit ein vielversprechendes Material für zukünftige medizinische Anwendungen dar. Neben der Biokompatibilität und Abbaubarkeit erlauben sie adäquate Interaktion der Zellen auf deren Oberfläche. Ist die Zelladhäsion zu schwach kann nicht genügend Haftung zur Zellmigration erzeugt werden, ist sie zu stark, sind die Zellen durch zu starke Bindung in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt. Durch Herstellung von Mischfilmen aus modifizierten und unmodifizierten Seidenproteinen und einer damit möglichen Kontrolle über die Zelladhäsion und Zellmigration kann das Anwendungsspektrum zusätzlich erweitert werden. So sind demnach Anwendungen der Mischfilme sowohl in der Geweberegeneration (Zellmigration erwünscht) aber auch als Gefäßersatz (Zellmigration unerwünscht) realisierbar.

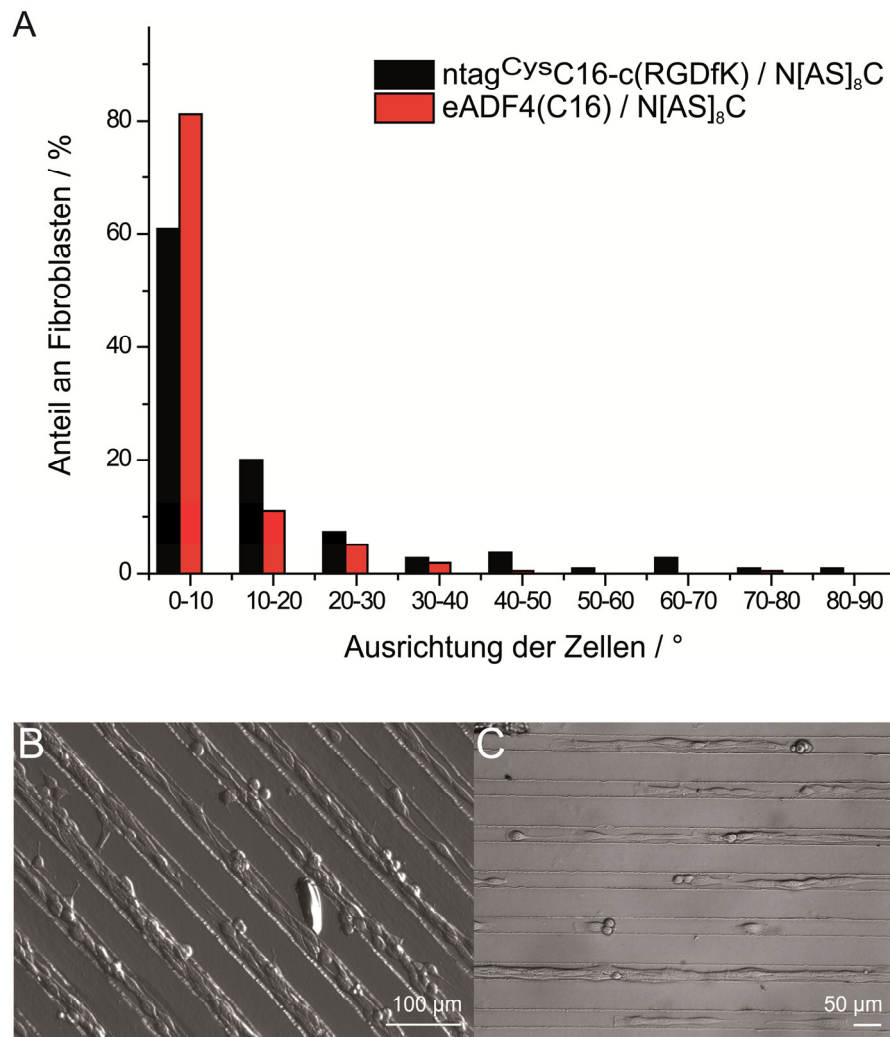
### 3.2 ZELLADHÄSION UND AUSRICHTUNG AUF STRUKTURIERTEN SEIDENFILMEN

*In vivo* wird die Ausrichtung, Form und Anordnung von Zellen und damit auch deren Funktion vor allem durch die extrazelluläre Matrix bestimmt. *In vitro* kann die Steuerung der Gewebeorganisation von Zellen über Kontaktführung (*contact guidance*) mittels topographischer Strukturen im Mikro- und Submikrobereich erfolgen (Bettinger, Langer *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurden strukturierte Seidenfilme mit parallelen Rillen und einer Fernordnung im Mikrometerbereich sowohl aus RGD-modifiziertem Protein (ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK)) als auch aus eADF4(C16) produziert. Dazu wurden mit Hilfe eines PDMS Templates Protein-Streifen auf einen vorher hergestellten Seidenfilm aufgebracht (Teilarbeit II, Abbildung 2). Die so entstandenen 20  $\mu\text{m}$  großen Rillen sind von einem Streifen mit einer Höhe von unter einem Mikrometer und einer Breite von 50  $\mu\text{m}$  getrennt (Teilarbeit II, Abbildung 4).

Der Ansatz durch Einführung einer Oberflächentopographie in eADF4(C16) *scaffolds* die Interaktion zwischen Zellen und Material entscheidend zu verbessern (Leal-Egana, Lang *et al.* 2012) konnte hier für die Zellausrichtung und Anordnung weiter entwickelt werden. Im Vergleich zu glatten eADF4(C16) Filmen wurde die Zelladhäsion auf strukturierten Filmen signifikant erhöht. Obwohl Fibroblasten sowohl in den Rillen als auch auf den Erhöhungen (63% der Zellen befanden sich in den Rillen) adhärirten, richteten sie sich trotzdem gestreckt entlang der Längsachse der Rillen aus. Im Gegensatz dazu ist die Interaktion zwischen Fibroblasten und Material auf mit Zelladhäsionspeptid modifizierten Seidenfilmen unabhängig von der Topographie. Die bereits auf flachen RGD-modifizierten Filmen gute Adhäsion konnte auf strukturierten Filmen nicht verbessert werden (Teilarbeit II, Abbildung 3 und 5 sowie Tabelle 1).

Da sich von den so hergestellten Seidenfilmen die aufgetragenen Streifen aufgrund der identischen Ladung der beiden Proteinschichten ablösen, wurde eine alternative strukturierte Oberfläche hergestellt, wobei zusätzlich zu den beiden Spinnenseidenproteinen das rekombinante Eierstiel-Seidenprotein N[AS]<sub>8</sub>C herangezogen wurde (Teilarbeit II, ergänzende Abbildung 1). Da Fibroblasten auf glatten Eierstiel-Seidenprotein-Filmen trotz der positiven Nettoladung eine abgerundete Morphologie zeigten (Teilarbeit II, Abbildung 1), bildet N[AS]<sub>8</sub>C zusammen mit den negativ geladenen Varianten von eADF4(C16) eine ideale mechanisch stabile Kombination, um Zelladhäsion auf bestimmte Flächen zu begrenzen (Teilarbeit II, Abbildung 1). Um Zelladhäsion in den Rillen zu fördern, wurden deshalb auf einen ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) Film Streifen aus N[AS]<sub>8</sub>C aufgebracht. Auf diesen Oberflächen richteten sich die Fibroblasten ähnlich zu den strukturierten eADF4(C16) Filmen entlang der Längsachse der Rillen aus, aber adhärirten dabei hauptsächlich (normiert auf die Fläche zu 94,2%) in den Rillen (Abbildung 16 A; Teilarbeit II, Abbildung 5 sowie Tabelle 1). Wird anstelle von ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK), eADF4(C16) verwendet zeigt sich ein vergleichbares Verhalten, wobei bezüglich Ausrichtung der Zellen eine weitere Verbesserung erzielt wurde (Abbildung 16 A; Teilarbeit II, Abbildung 5 sowie Tabelle 1). Nach längerer Kultivierung der Fibroblasten konnte außerdem gezeigt werden, dass die Zellen bis zu einer hohen Zelldichte, vorwiegend in den Rillen, proliferieren (Abbildung 16 B; Teilarbeit II, Abbildung 6).





**Abbildung 16: Zellausrichtung auf strukturierten Seidenfilmen.** A) Ausrichtung von BALB/3T3 Fibroblasten auf Seidenoberflächen mit definierten Mustern aus zwei unterschiedlichen Proteinen (Rille/Streifen). Die Ausrichtung der Zellen wurde relativ zur Richtung der Rillen bestimmt (vgl. auch Teilarbeit II, ergänzende Abbildung 3). B) BALB/3T3 Fibroblasten auf strukturierten Seidenfilmen aus eADF4(C16)/N[AS]<sub>8</sub>C (Rille/Streifen) nach einer Kultivierung über einen Zeitraum von 96 Stunden. C) C2C12 Myoblasten auf eADF4(C16)/N[AS]<sub>8</sub>C (Rille/Streifen) nach einer Inkubation von 48 Stunden. Die Myoblasten adhären und proliferieren vorwiegend in den eADF4(C16) Rillen und zeigen damit ein ähnliches Verhalten wie Fibroblasten. Die hohe Zelldichte nach 48 Stunden führte zu einer Bildung von ausgerichteten Myotuben (Bauer, Wohlrab *et al.* 2013). Modifiziert nach *Biomaterials Science* **2013**, 1(12): 1244-1249 mit freundlicher Genehmigung des Verlages The Royal Society of Chemistry.

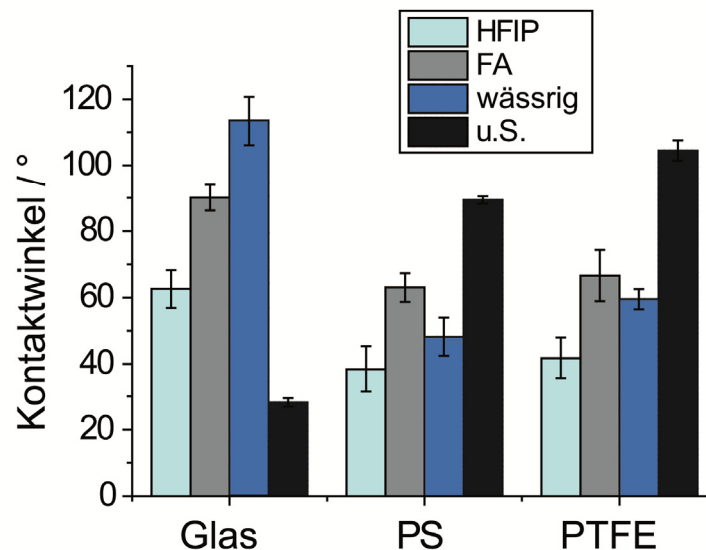
Stabile strukturierte Filme aus zwei unterschiedlichen Seidenproteinen ermöglichten eine Ausrichtung und Anordnung diverser Zelllinien (Abbildung 16 B, C; Teilarbeit II Abbildung 5 und 6). Angesichts der räumlichen Kontrolle der Zell-Organisation auf zweidimensionalen Oberflächen, werden damit zusätzlich neue Perspektiven für unterschiedliche Anwendungen (z. B. Hornhautimplantat, Knochenimplantate) eröffnet. Realisierbar sind auch dreidimensionale *scaffolds* aus einer äußeren Ummantelung eines

strukturierten Filmes und einer inneren Schicht aus ausgerichteten Elektrogenesponnenen Fasern z.B. für einen Einsatz in der Nervenregeneration.

### 3.3 BENETZBARKEIT VON SPINNENSEIDENFILMEN

Vor der eigentlichen Zelladhäsion auf Materialien findet innerhalb von Nanosekunden eine Wechselwirkung der Oberfläche mit Proteinen statt. Die Benetzbarkeit bestimmt dabei sowohl welche, aber auch in welchem Umfang Proteine und andere Moleküle mit der Oberfläche interagieren. Das Biomaterial ist also innerhalb kürzester Zeit mit einer Proteinschicht bedeckt, welche wiederum als Vermittler der Folgeereignisse wie Zelladhäsion und Proliferation diverser Zelltypen dient (Roach, Eglin *et al.* 2007).

In dieser Arbeit sollten deshalb aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) biokompatible Oberflächen mit einstellbarer Benetzbarkeit produziert werden. Aufgrund der amphiphilen Eigenschaften des Proteins, bestehen eADF4(C16) Filme aus hydrophoben  $\beta$ -Faltblatt Nanokristallen, welche in einer amorphen hydrophilen Matrix eingebettet sind (Metwalli, Slotta *et al.* 2007; Spiess, Ene *et al.* 2011). Als Modelloberflächen wurden die hydrophoben Oberflächen Teflon (Polytetrafluorethylen, PTFE) und Polystyrol (PS) ebenso wie das hydrophile Substrat Glas ausgewählt. Da des Weiteren aus vorangegangenen Studien bekannt ist, dass unterschiedliche Lösungsmittel einen Einfluss auf die Sekundärstruktur im Seidenfilm haben (Spiess, Ene *et al.* 2011), wurden hier neben wässrigen Puffersystemen auch Hexafluoroisopropanol (HFIP) und Ameisensäure (*formic acid*, FA) als Lösungsmittel eingesetzt und die so produzierten Filme analysiert. Charakterisierung der Beschichtung mittels Rasterkraftmikroskopie zeigte, dass alle Seidenfilme unabhängig von Substrat und Lösungsmittel eine homogene Oberfläche mit einer geringen Rauigkeit ( $R_a < 30$  nm) aufweisen (Teilarbeit III Tabelle 1). Da neben der Rauigkeit des Materials vor allem dessen Benetzbarkeit die Proteinadsorption/Zelladhäsion bestimmt (Tamada und Ikada 1994), wurde im folgenden der Kontaktwinkel (*contact angle*, CA) an der Film-Luft-Wasser Grenzfläche analysiert, was Rückschlüsse auf die Hydrophobizität des Materials erlaubt.



**Abbildung 17: Bestimmung der Oberflächenhydrophobizität von Seidenbeschichtungen.** Nach Filmherstellung und Nachbehandlung mit Methanol, wurde der Kontaktwinkel mit Wasser ( $H_2O_{MQ}$ ) auf den unterschiedlichen Seidenoberflächen analysiert. In dieser Arbeit wurde die Methode des liegenden Tropfens angewandt und der Kontaktwinkel mittels Laplace Young Fit bestimmt. Als Referenz wurden die Kontaktwinkel auf unbehandelten Substraten (u.S.) gemessen (Wohlrab, Spiess *et al.* 2012). Modifiziert nach *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22(41): 22050-22054 mit freundlicher Genehmigung des Verlages The Royal Society of Chemistry.

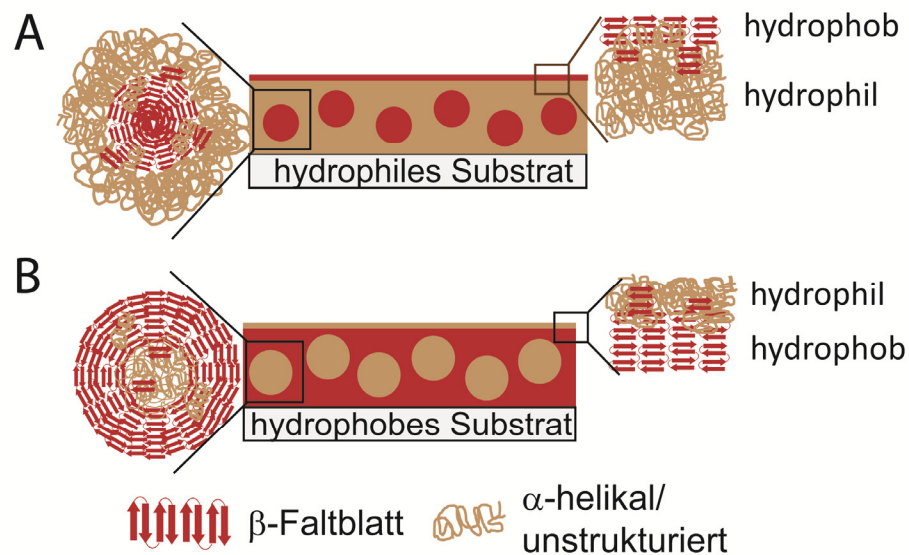
Dabei wurde unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel in allen Fällen eine Umkehr der Hydrophobizität des Proteinfilms im Vergleich zum Substrat beobachtet. Die Wasser Kontaktwinkel der hydrophoben Oberflächen (PS 90°, PTFE 105°) wurden dabei durch die Seidenbeschichtung abhängig vom Lösungsmittel auf 39-63° reduziert, wohingegen auf Glas eine Erhöhung von 28° auf 62-113° induziert wurde (Abbildung 17, Teilarbeit III Abbildung 2 A). Um einen direkten Einfluss des Materials auf die Seidenproteine zu bestätigen, wurden auch die Wasser Kontaktwinkel der Film-Substrat Grenzfläche analysiert. Es zeigte sich dabei unter anderem, dass HFIP-Seidenfilme auf Teflon im Gegensatz zu der hydrophilen Film-Luft Grenzfläche (CA = 42°) eine hydrophobe Film-Substrat-Grenzfläche (CA = 74°) aufweisen (Teilarbeit III, Abbildung 2 B und C).

Dieser Effekt beruht vermutlich auf der in der Polymerchemie bekannten Ausbildung von Mikrodomänen in Blockcopolymeren (Förster und Plantenberg 2002). So wurde eine Selbstassemblierung in Mikrodomänen bereits in natürlicher Spinnenseide, aber auch in Spinnenseiden-basierten Multiblockcopolymeren und *B. mori* Seidenfibroin-Filmen beobachtet (Rathore und Sogah 2001; Hermanson, Huemmerich *et al.* 2007; Rammensee,

Slotta *et al.* 2008; Gebhardt, Vendrely *et al.* 2009; Hu, Lu *et al.* 2009; Heim, Romer *et al.* 2010). Da die hier hergestellten Seidenbeschichtungen aufgrund der geringen Dicke nicht als *bulk* Material betrachtet werden können, müssen zusätzlich die unterschiedlichen Grenzflächen (z.B. Protein-Substratoberfläche) mit in Betracht gezogen werden.

Basierend auf den vorliegenden Erkenntnissen wurde deshalb ein Modell zur Selbstassemblierung von eADF4(C16) Proteinen auf Substraten unterschiedlicher Hydrophibizität vorgeschlagen (Abbildung 18 sowie Teilarbeit III, Abbildung 6). Während der Filmbildung kommt es an der Grenzfläche Substrat-Protein zu einer Wechselwirkung zwischen den hydrophilen Glycin-reichen Blöcken und der hydrophilen Glasoberfläche (Abbildung 18 A, Teilarbeit III, Abbildung 6). Durch die Tendenz der eADF4(C16) Moleküle bei steigender Proteinkonzentration die Interaktionen zwischen hydrophilen (Glycin-reich) und hydrophoben (Alanin-reich) Blöcken zu minimieren, werden so hydrophobe Bereiche ausgebildet, welche von einer Matrix aus hydrophilen Aminosäuren umgeben sind. Anstatt zur vorwiegend hydrophilen Matrix sind die hydrophoben Bereiche an der Protein-Luft Grenzfläche hauptsächlich zur Luft hin exponiert. Durch vollständige Trocknung und Nachbehandlung wird die Faltung der Polyalanine in  $\beta$ -Faltblatt Kristalle induziert, wobei die Glycin-reichen Blöcke unstrukturiert oder in helikaler Konformation verbleiben. Diese strukturelle Anordnung der Proteine konnte mit FTIR-Messungen bestätigt werden (Teilarbeit III, Abbildung 3).

Dementsprechend bestehen Filme auf hydrophoben Oberflächen aus einer hydrophoben Matrix mit darin eingeschlossenen hydrophilen Bereichen (Abbildung 18 B, Teilarbeit III, Abbildung 6). An der Grenzfläche zu Luft befinden sich in erster Linie hydrophile Aminosäuren, was wiederum zu einem niedrigeren Wasser Kontaktwinkel führt.



**Abbildung 18: Modell zur Mikrophasenseparation von eADF4(C16) Proteinen auf Oberflächen.** Abhängig von der Hydrophobizität der Substrate entstehen Seidenfilme mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften (Wohlrab, Spiess *et al.* 2012). Modifiziert nach *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22(41): 22050-22054 mit freundlicher Genehmigung des Verlages The Royal Society of Chemistry.

Um die Phasenseparation der hydrophilen amorphen und hydrophoben  $\beta$ -Faltblatt reichen Bereichen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Substraten zu bestätigen, erfolgte ein enzymatischer Verdau der Seidenfilme durch  $\alpha$ -Chymotrypsin (Teilarbeit III, Abbildungen 3 und 5 sowie Tabelle 3). In vorangegangenen Studien wurde bereits gezeigt, dass nicht-kristalline Bereiche in Seidenfilmen schneller durch das Enzym abgebaut werden als  $\beta$ -Faltblatt Kristalle (Arai, Freddi *et al.* 2004). Hier zeigte sich, dass die mit  $\alpha$ -Chymotrypsin behandelten Seidenbeschichtungen auf hydrophoben Oberflächen eine glatte Oberfläche mit 50 bis 150 nm großen Löchern aufwiesen, was auf eine  $\beta$ -Faltblatt-reiche Matrix mit kleinen abgegrenzten amorphen Bereichen hindeutet. Filme auf dem hydrophilen Glas dagegen zeigten durch den Abbau der umgebenden hydrophilen amorphen Matrix partikuläre Strukturen (Teilarbeit III, Abbildung 6).

Durch die Möglichkeit der Änderung des Benetzungsgrades kann dieser, je nach Anwendung, gezielt eingestellt werden. Zum einen kann so die Adhäsion und somit auch die Proliferation eines Zelltyps auf der Oberfläche gesteuert und zum anderen die Interaktion dieses Zelltyps in Abhängigkeit der Hydrophobizität analysiert werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien in diesem Bereich, welche mit unterschiedlichen Materialien arbeiten (Tamada und Ikada 1994), kann hier mit dem gleichem Material und damit der

gleichen chemischen Zusammensetzung und ähnlicher Rauigkeit gearbeitet werden und so der direkte Einfluss der Benetzbarkeit auf die Zelladhäsion analysiert werden.

## 4 LITERATURVERZEICHNIS

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, R. Keith und P. Walter (2011). *Molekularbiologie der Zelle*, Wiley-VCH.
- Amsden, J. J., P. Domachuk, A. Gopinath, R. D. White, L. Dal Negro, D. L. Kaplan und F. G. Omenetto (2010). "Rapid nanoimprinting of silk fibroin films for biophotonic applications." *Advanced Materials* **22**(15): 1746-1749.
- Amsden, J. J., H. Perry, S. V. Boriskina, A. Gopinath, D. L. Kaplan, L. Dal Negro und F. G. Omenetto (2009). "Spectral analysis of induced color change on periodically nanopatterned silk films." *Optics Express* **17**(23): 21271-21279.
- Anselme, K. (2000). "Osteoblast adhesion on biomaterials." *Biomaterials* **21**(7): 667-681.
- Anselme, K. und M. Biggerelle (2011). "Role of materials surface topography on mammalian cell response." *International Materials Reviews* **56**(4): 243-266.
- Aprhisiart, A. und F. Vollrath (1994). "Design-features of the orb web of the spider, *Araneus diadematus*." *Behavioral Ecology* **5**(3): 280-287.
- Arai, T., G. Freddi, R. Innocenti und M. Tsukada (2004). "Biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin fibers and films." *Journal of Applied Polymer Science* **91**(4): 2383-2390.
- Arcidiacono, S., C. Mello, D. Kaplan, S. Cheley und H. Bayley (1998). "Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*." *Applied Microbiology and Biotechnology* **49**(1): 31-38.
- Arcidiacono, S., C. M. Mello, M. Butler, E. Welsh, J. W. Soares, A. Allen, D. Ziegler, T. Laue und S. Chase (2002). "Aqueous processing and fiber spinning of recombinant spider silks." *Macromolecules* **35**(4): 1262-1266.
- Arnaout, M. A., B. Mahalingam und J. P. Xiong (2005). "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **21**: 381-410.
- Askari, J. A., P. A. Buckley, A. P. Mould und M. J. Humphries (2009). "Linking integrin conformation to function." *Journal of Cell Science* **122**(2): 165-170.
- Askarieh, G., M. Hedhammar, K. Nordling, A. Saenz, C. Casals, A. Rising, J. Johansson und S. D. Knight (2010). "Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay." *Nature* **465**(7295): 236-238.

- Auernheimer, J., D. Zukowski, C. Dahmen, M. Kantlehner, A. Enderle, S. L. Goodman und H. Kessler (2005). "Titanium implant materials with improved biocompatibility through coating with phosphonate-anchored cyclic RGD peptides." *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **6**(11): 2034-2040.
- Augsten, K., P. Muhlig und C. Herrmann (2000). "Glycoproteins and skin-core structure in *Nephila clavipes* spider silk observed by light and electron microscopy." *Scanning* **22**(1): 12-15.
- Ayoub, N. A., J. E. Garb, R. M. Tinghitella, M. A. Collin und C. Y. Hayashi (2007). "Blueprint for a high-performance biomaterial: Full-length spider dragline silk genes." *PloS one* **2**(6).
- Barczyk, M., S. Carracedo und D. Gullberg (2010). "Integrins." *Cell and tissue research* **339**(1): 269-280.
- Bates, F. S. und G. H. Fredrickson (1990). "Block copolymer thermodynamics - Theory and experiment." *Annual Review of Physical Chemistry* **41**: 525-557.
- Bauer, F., L. Bertinetti, A. Masic und T. Scheibel (2012). "Dependence of mechanical properties of lacewing egg stalks on relative humidity." *Biomacromolecules* **13**(11): 3730-3735.
- Bauer, F. und T. Scheibel (2012). "Artificial egg stalks made of a recombinantly produced lacewing silk protein." *Angewandte Chemie-International Edition* **51**(26): 6521-6524.
- Bauer, F., S. Wohlrab und T. Scheibel (2013). "Controllable cell adhesion, growth and orientation on layered silk protein films." *Biomaterials Science* **1**(12): 1244-1249.
- Belton, D. J., A. J. Mieszawska, H. A. Currie, D. L. Kaplan und C. C. Perry (2012). "Silk-silica composites from genetically engineered chimeric proteins: Materials properties correlate with silica condensation rate and colloidal stability of the proteins in aqueous solution." *Langmuir* **28**(9): 4373-4381.
- Bettinger, C. J., R. Langer und J. T. Borenstein (2009). "Engineering substrate topography at the micro- and nanoscale to control cell function." *Angewandte Chemie-International Edition* **48**(30): 5406-5415.
- Bini, E., C. W. Foo, J. Huang, V. Karageorgiou, B. Kitchel und D. L. Kaplan (2006). "RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial." *Biomacromolecules* **7**(11): 3139-3145.
- Blackledge, T. A. und C. Y. Hayashi (2006). "Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775)." *Journal of Experimental Biology* **209**(13): 2452-2461.



- Blüm, C., A. Nichtl und T. Scheibel (2013). "spider silk capsules as protective reaction containers for enzymes." *Advanced Functional Materials*: 763–768.
- Blüm, C. und T. Scheibel (2012). "Control of drug loading and release properties of spider silk sub-microparticles." *BioNanoScience* **2**(2): 67-74.
- Blystone, S. D. (2004). "Integrating an integrin: a direct route to actin." *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1692**(2-3): 47-54.
- Bon, M. (1710). "A discourse upon the usefulness of the silk of spiders." *Philosophical Transactions* **27**: 2-16.
- Branco, M. C. und J. P. Schneider (2009). "Self-assembling materials for therapeutic delivery." *Acta Biomaterialia* **5**(3): 817-831.
- Brenckle, M. A., H. Tao, S. Kim, M. Paquette, D. L. Kaplan und F. G. Omenetto (2013). "Protein-protein nanoimprinting of silk fibroin films." *Advanced Materials* **25**(17): 2409-2414.
- Britland, S., P. Clark, P. Connolly und G. Moores (1992). "Micropatterned substratum adhesiveness: a model for morphogenetic cues controlling cell behavior." *Experimental Cell Research* **198**(1): 124-129.
- Brooks, A. E., S. R. Nelson, J. A. Jones, C. Koenig, M. Hinman, S. Stricker und R. V. Lewis (2008). "Distinct contributions of model MaSp1 and MaSp2 like peptides to the mechanical properties of synthetic major ampullate silk fibers as revealed in silico." *Nanotechnology, Science and Applications* **1**: 9-16.
- Brooks, A. E., H. B. Steinkraus, S. R. Nelson und R. V. Lewis (2005). "An investigation of the divergence of major ampullate silk fibers from *Nephila clavipes* and *Argiope aurantia*." *Biomacromolecules* **6**(6): 3095-3099.
- Brooks, A. E., S. M. Stricker, S. B. Joshi, T. J. Kamerzell, C. R. Middaugh und R. V. Lewis (2008). "Properties of synthetic spider silk fibers based on *Argiope aurantia* MaSp2." *Biomacromolecules* **9**(6): 1506-1510.
- Buchko, C. J., L. C. Chen, Y. Shen und D. C. Martin (1999). "Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films." *Polymer* **40**(26): 7397-7407.
- Campbell, I. D. und M. J. Humphries (2011). "Integrin structure, activation, and interactions." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**(3): 1-14.
- Chen, W., S. Weng, F. Zhang, S. Allen, X. Li, L. Bao, R. H. W. Lam, J. A. Macoska, S. D. Merajver und J. Fu (2012). "Nanoroughened surfaces for efficient capture of circulating tumor cells without using capture antibodies." *ACS Nano* **7**(1): 566-575.

- Chengjie, F., S. Zhengzhong und F. Vollrath (2009). "Animal silks: their structures, properties and artificial production." *Chemical Communications*(43): 6515-6529.
- Clark, P., P. Connolly und G. R. Moores (1992). "Cell guidance by micropatterned adhesiveness in vitro." *Journal of Cell Science* **103 ( Pt 1)**: 287-292.
- Craig, C. L. (1997). "Evolution of arthropod silks." *Annual Review of Entomology* **42**: 231-267.
- Craig, C. L., C. Riekel, M. E. Herberstein, R. S. Weber, D. Kaplan und N. E. Pierce (2000). "Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders." *Molecular Biology and Evolution* **17**(12): 1904-1913.
- Currie, H. A., O. Deschaume, R. R. Naik, C. C. Perry und D. L. Kaplan (2011). "Genetically engineered chimeric silk-silver binding proteins." *Advanced Functional Materials* **21**(15): 2889-2895.
- Darling, S. B. (2007). "Directing the self-assembly of block copolymers." *Progress in Polymer Science* **32**(10): 1152-1204.
- Dee, K. C., T. T. Andersen und R. Bizios (1998). "Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials." *Journal of Biomedical Materials Research* **40**(3): 371-377.
- Dicko, C., D. Knight, J. M. Kenney und F. Vollrath (2004). "Secondary structures and conformational changes in flagelliform, cylindrical, major, and minor ampullate silk proteins. Temperature and concentration effects." *Biomacromolecules* **5**(6): 2105-2115.
- Dunehoo, A. L., M. Anderson, S. Majumdar, N. Kobayashi, C. Berkland und T. J. Siahaan (2006). "Cell adhesion molecules for targeted drug delivery." *Journal of Pharmaceutical Sciences* **95**(9): 1856-1872.
- Eisoldt, L., A. Smith und T. Scheibel (2011). "Decoding the secrets of spider silk." *Materials Today* **14**(3): 80-86.
- Elangbam, C. S., C. W. Qualls und R. R. Dahlgren (1997). "Cell adhesion molecules - Update." *Veterinary Pathology* **34**(1): 61-73.
- Fahnestock, S. (1994). Novel, recombinantly produced spider silk analogs. W. E.I. DuPont. USA.
- Fahnestock, S. R. und S. L. Irwin (1997). "Synthetic spider dragline silk proteins and their production in Escherichia coli." *Applied Microbiology and Biotechnology* **47**(1): 23-32.

- Flemming, R. G., C. J. Murphy, G. A. Abrams, S. L. Goodman und P. F. Nealey (1999). "Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior." *Biomaterials* **20**(6): 573-588.
- Foo, C. W. P., S. V. Patwardhan, D. J. Belton, B. Kitchel, D. Anastasiades, J. Huang, R. R. Naik, C. C. Perry und D. L. Kaplan (2006). "Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**(25): 9428-9433.
- Förster, S., B. Berton, H. P. Hentze, E. Kramer, M. Antonietti und P. Lindner (2001). "Lyotropic phase morphologies of amphiphilic block copolymers." *Macromolecules* **34**(13): 4610-4623.
- Förster, S. und T. Plantenberg (2002). "From self-organizing polymers to nanohybrid and biomaterials." *Angewandte Chemie-International Edition* **41**(5): 689-714.
- Fox, L. R. (1975). "Cannibalism in natural-populations." *Annual Review of Ecology and Systematics* **6**: 87-106.
- Fraser, S. A., Y. H. Ting, K. S. Mallon, A. E. Wendt, C. J. Murphy und P. F. Nealey (2008). "Sub-micron and nanoscale feature depth modulates alignment of stromal fibroblasts and corneal epithelial cells in serum-rich and serum-free media." *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **86A**(3): 725-735.
- Fredrickson, G. H. und F. S. Bates (1996). "Dynamics of block copolymers: Theory and experiment." *Annual Review of Materials Science* **26**: 501-550.
- Frenot, A. und I. S. Chronakis (2003). "Polymer nanofibers assembled by electrospinning." *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **8**(1): 64-75.
- Frische, S., A. B. Maunsbach und F. Vollrath (1998). "Elongate cavities and skin-core structure in Nephila spider silk observed by electron microscopy." *Journal of Microscopy-Oxford* **189**: 64-70.
- Fukushima, Y. (1998). "Genetically engineered syntheses of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequence of spider dragline silk." *Biopolymers* **45**(4): 269-279.
- Garb, J. E., N. A. Ayoub und C. Y. Hayashi (2010). "Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains." *BMC evolutionary biology* **10**(243 ): 1-16.
- Gartner, T. K. und J. S. Bennett (1985). "The tetrapeptide analogue of the cell attachment site of fibronectin inhibits platelet aggregation and fibrinogen binding to activated platelets." *The Journal of Biological Chemistry* **260**(22): 11891-11894.

- Gatesy, J., C. Hayashi, D. Motriuk, J. Woods und R. Lewis (2001). "Extreme diversity, conservation, and convergence of spider silk fibroin sequences." *Science* **291**(5513): 2603-2605.
- Gebhardt, R., C. Vendrely, M. Burghammer und C. Riekel (2009). "Characterization of the boundary zone of a cast protein drop: fibroin beta-sheet and nanofibril formation." *Langmuir* **25**(11): 6307-6311.
- Geddes, A. J., K. D. Parker, E. D. Atkins und E. Beighton (1968). "'Cross-beta' conformation in proteins." *Journal of Molecular Biology* **32**(2): 343-358.
- Giancotti, F. G. und E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." *Science* **285**(5430): 1028-1032.
- Gil, E. S., S. H. Park, J. Marchant, F. Omenetto und D. L. Kaplan (2010). "Response of human corneal fibroblasts on silk film surface patterns." *Macromolecular Bioscience* **10**(6): 664-673.
- Gomes, S. C., I. B. Leonor, J. F. Mano, R. L. Reis und D. L. Kaplan (2011). "Antimicrobial functionalized genetically engineered spider silk." *Biomaterials* **32**(18): 4255-4266.
- Gosline, J. M., P. A. Guerette, C. S. Ortlepp und K. N. Savage (1999). "The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function." *Journal of Experimental Biology* **202**(23): 3295-3303.
- Gosline, J. M., C. C. Pollak, P. A. Guerette, A. Cheng, M. E. Demont und M. W. Denny (1994). "Elastomeric network models for the frame and viscid silks from the orb web of the spider *Araneus-diadematus*." *Silk Polymers* **544**: 328-341.
- Greiner, A. und J. H. Wendorff (2007). "Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres." *Angewandte Chemie-International Edition* **46**(30): 5670-5703.
- Grubb, D. T. und L. W. Jelinski (1997). "Fiber morphology of spider silk: The effects of tensile deformation." *Macromolecules* **30**(10): 2860-2867.
- Guerette, P. A., D. G. Ginzinger, B. H. Weber und J. M. Gosline (1996). "Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family." *Science* **272**(5258): 112-115.
- Gupta, M. K., S. K. Khokhar, D. M. Phillips, L. A. Sowards, L. F. Drummy, M. P. Kadakia und R. R. Naik (2007). "Patterned silk films cast from ionic liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth." *Langmuir* **23**(3): 1315-1319.
- Gurrath, M., G. Muller, H. Kessler, M. Aumailley und R. Timpl (1992). "Conformation activity studies of rationally designed potent antiadhesive RGD peptides." *European Journal of Biochemistry* **210**(3): 911-921.

- Hagn, F., L. Eisoldt, J. G. Hardy, C. Vendrely, M. Coles, T. Scheibel und H. Kessler (2010). "A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly." *Nature* **465**(7295): 239-242.
- Hagn, F., C. Thamm, T. Scheibel und H. Kessler (2011). "pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk--implications for fiber formation." *Angewandte Chemie-International Edition* **50**(1): 310-313.
- Hajer, J. und D. Rehakova (2003). "Spinning activity of the spider *Trogloneta granulum* (Araneae, Mysmenidae): web, cocoon, cocoon handling behaviour, draglines and attachment discs." *Zoology* **106**(3): 223-231.
- Hardy, J. G., L. M. Römer und T. R. Scheibel (2008). "Polymeric materials based on silk proteins." *Polymer* **49**(20): 4309-4327.
- Harrison, R. G. (1911). "On the stereotropism of embryonic cells." *Science* **34**(870): 279-281.
- Hayashi, C. Y., T. A. Blackledge und R. V. Lewis (2004). "Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: Uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family." *Molecular Biology and Evolution* **21**(10): 1950-1959.
- Healy, K. E. (1999). "Molecular engineering of materials for bioreactivity." *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **4**(4): 381-387.
- Healy, K. E., C. H. Thomas, A. Rezaia, J. E. Kim, P. J. McKeown, B. Lom und P. E. Hockberger (1996). "Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry." *Biomaterials* **17**(2): 195-208.
- Heckmann, D. und H. Kessler (2007). "Design and chemical synthesis of integrin ligands." *Methods in Enzymology* **426**: 463-503.
- Heidebrecht, A. und T. Scheibel (2013). "Recombinant production of spider silk proteins." *Advances in Applied Microbiology, Vol 82* **82**: 115-153.
- Heikkila, P. und A. Harlin (2008). "Parameter study of electrospinning of polyamide-6." *European Polymer Journal* **44**(10): 3067-3079.
- Heim, M., C. B. Ackerschott und T. Scheibel (2010). "Characterization of recombinantly produced spider flagelliform silk domains." *Journal of Structural Biology* **170**(2): 420-425.
- Heim, M., L. Romer und T. Scheibel (2010). "Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins." *Chemical Society Reviews* **39**(1): 156-164.

- Heitz, J. R., C. D. Anderson und B. M. Anderson (1968). "Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **127**(1-3): 627-636.
- Hermanson, K. D., M. B. Harasim, T. Scheibel und A. R. Bausch (2007). "Permeability of silk microcapsules made by the interfacial adsorption of protein." *Physical Chemistry Chemical Physics* **9**(48): 6442-6446.
- Hermanson, K. D., D. Huemmerich, T. Scheibel und A. R. Bausch (2007). "Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk." *Advanced Materials* **19**(14): 1810-1815.
- Hern, D. L. und J. A. Hubbell (1998). "Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing." *Journal of Biomedical Materials Research* **39**(2): 266-276.
- Hersel, U., C. Dahmen und H. Kessler (2003). "RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond." *Biomaterials* **24**(24): 4385-4415.
- Hinman, M. B. und R. V. Lewis (1992). "Isolation of a clone encoding a 2nd dragline silk fibroin - *Nephila-clavipes* dragline silk is a 2-protein fiber." *Journal of Biological Chemistry* **267**(27): 19320-19324.
- Hlady, V. V. und J. Buijs (1996). "Protein adsorption on solid surfaces." *Current Opinion in Biotechnology* **7**(1): 72-77.
- Hoffman-Kim, D., J. A. Mitchel und R. V. Bellamkonda (2010). "Topography, Cell Response, and Nerve Regeneration." *Annual Review of Biomedical Engineering, Vol 12* **12**: 203-231.
- Hofmann, S., C. T. W. P. Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D. L. Kaplan, H. P. Merkle und L. Meinel (2006). "Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery." *Journal of Controlled Release* **111**(1-2): 219-227.
- Hu, X., Q. Lu, D. L. Kaplan und P. Cebe (2009). "Microphase separation controlled beta-sheet crystallization kinetics in fibrous proteins." *Macromolecules* **42**(6): 2079-2087.
- Hu, X., K. Shmelev, L. Sun, E. S. Gil, S. H. Park, P. Cebe und D. L. Kaplan (2011). "Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing." *Biomacromolecules* **12**(5): 1686-1696.
- Huang, J., C. Wong, A. George und D. L. Kaplan (2007). "The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein 1 chimeric protein on hydroxyapatite nucleation." *Biomaterials* **28**(14): 2358-2367.

- Huang, W., Z. Lin, Y. M. Sin, D. Li, Z. Gong und D. Yang (2006). "Characterization and expression of a cDNA encoding a tubuliform silk protein of the golden web spider *Nephila antipodiana*." *Biochimie* **88**(7): 849-858.
- Huang, Z. M., Y. Z. Zhang, M. Kotaki und S. Ramakrishna (2003). "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites." *Composites Science and Technology* **63**(15): 2223-2253.
- Hubbell, J. A., S. P. Massia, N. P. Desai und P. D. Drumheller (1991). "Endothelial cell-selective materials for tissue engineering in the vascular graft via a new receptor." *Bio-Technology* **9**(6): 568-572.
- Huemmerich, D., C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph und T. Scheibel (2004). "Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility." *Biochemistry* **43**(42): 13604-13612.
- Huemmerich, D., T. Scheibel, F. Vollrath, S. Cohen, U. Gat und S. Ittah (2004). "Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins." *Current Biology* **14**(22): 2070-2074.
- Huemmerich, D., U. Slotta und T. Scheibel (2006). "Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins." *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **82**(2): 219-222.
- Humenik, M. und T. Scheibel (2014). "Nanomaterial building blocks based on spider silk-oligonucleotide conjugates." *ACS Nano* **8**(2): 1342-1349.
- Humenik, M., T. Scheibel und A. Smith (2011). "Spider silk: Understanding the structure-function relationship of a natural fiber." *Molecular Assembly in Natural and Engineered Systems, Vol 103* **103**: 131-185.
- Humenik, M., A. M. Smith und T. Scheibel (2011). "Recombinant Spider Silks-Biopolymers with Potential for Future Applications." *Polymers* **3**(1): 640-661.
- Humphries, J. D., A. Byron und M. J. Humphries (2006). "Integrin ligands at a glance." *Journal of Cell Science* **119**(Pt 19): 3901-3903.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell* **69**(1): 11-25.
- Hynes, R. O. (1999). "Cell adhesion: old and new questions." *Trends in Biochemical Sciences* **24**(12): M33-M37.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-687.

- Jeffries, E. M. und Y. Wang (2013). "Incorporation of parallel electrospun fibers for improved topographical guidance in 3D nerve guides." *Biofabrication* **5**(3): 035015.
- Jiang, C. Y., X. Y. Wang, R. Gunawidjaja, Y. H. Lin, M. K. Gupta, D. L. Kaplan, R. R. Naik und V. V. Tsukruk (2007). "Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films." *Advanced Functional Materials* **17**(13): 2229-2237.
- Jin, H. J., S. V. Fridrikh, G. C. Rutledge und D. L. Kaplan (2002). "Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide)." *Biomacromolecules* **3**(6): 1233-1239.
- Kantlehner, M., P. Schaffner, D. Finsinger, J. Meyer, A. Jonczyk, B. Diefenbach, B. Nies, G. Holzemann, S. L. Goodman und H. Kessler (2000). "Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation." *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology* **1**(2): 107-114.
- Kelleher, S., A. Jongerius, A. Loebus, C. Strehmel, Z. F. Zhang und M. C. Lensen (2012). "AFM characterization of elastically micropatterned surfaces fabricated by fill-molding in capillaries (FIMIC) and investigation of the topographical influence on cell adhesion to the patterns." *Advanced Engineering Materials* **14**(3): B56-B66.
- Kim, D. H., J. Viventi, J. J. Amsden, J. L. Xiao, L. Vigeland, Y. S. Kim, J. A. Blanco, B. Panilaitis, E. S. Frechette, D. Contreras, D. L. Kaplan, F. G. Omenetto, Y. G. Huang, K. C. Hwang, M. R. Zakin, B. Litt und J. A. Rogers (2010). "Dissolvable films of silk fibroin for ultrathin conformal bio-integrated electronics." *Nature Materials* **9**(6): 511-517.
- Kim, E., Y. N. Xia und G. M. Whitesides (1996). "Micromolding in capillaries: Applications in materials science." *Journal of the American Chemical Society* **118**(24): 5722-5731.
- Kim, J., D. H. Kim, K. T. Lim, H. Seonwoo, S. H. Park, Y. R. Kim, Y. Kim, Y. H. Choung, P. H. Choung und J. H. Chung (2012). "Charged nanomaterials as efficient platforms for modulating cell adhesion and shape." *Tissue engineering. Part C, Methods* **18**(12): 913-923.
- Kita-Tokarczyk, K., M. Junginger, S. Belegriou und A. Taubert (2011). Amphiphilic polymers at interfaces. *Self Organized Nanostructures of Amphiphilic Block Copolymers II*. A. H. E. Müller und O. Borisov, Springer Berlin Heidelberg. **242**: 151-201.
- Kummerlen, J., J. D. van Beek, F. Vollrath und B. H. Meier (1996). "Local structure in spider dragline silk investigated by two-dimensional spin-diffusion nuclear magnetic resonance." *Macromolecules* **29**(8): 2920-2928.
- Kurland, N. E., T. Dey, S. C. Kundu und V. K. Yadavalli (2013). "Precise patterning of silk microstructures using photolithography." *Advanced Materials* **25**(43): 6207-6212.
- La Mattina, C., R. Reza, X. Hu, A. M. Falick, K. Vasanthavada, S. McNary, R. Yee und C. A. Vierra (2008). "Spider minor ampullate silk proteins are constituents of prey



- wrapping silk in the cob weaver *Latrodectus hesperus*." *Biochemistry* **47**(16): 4692-4700.
- Lammel, A., M. Schwab, M. Hofer, G. Winter und T. Scheibel (2011). "Recombinant spider silk particles as drug delivery vehicles." *Biomaterials* **32**(8): 2233-2240.
- Lawrence, B. D., J. K. Marchant, M. A. Pindrus, F. G. Omenetto und D. L. Kaplan (2009). "Silk film biomaterials for cornea tissue engineering." *Biomaterials* **30**(7): 1299-1308.
- Lazaris, A., S. Arcidiacono, Y. Huang, J. F. Zhou, F. Duguay, N. Chretien, E. A. Welsh, J. W. Soares und C. N. Karatzas (2002). "Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells." *Science* **295**(5554): 472-476.
- Leal-Egana, A., A. Diaz-Cuenca und A. R. Boccaccini (2013). "Tuning of cell-biomaterial anchorage for tissue regeneration." *Advanced Materials* **25**(29): 4049-4057.
- Leal-Egana, A., G. Lang, C. Mauerer, J. Wickinghoff, M. Weber, S. Geimer und T. Scheibel (2012). "Interactions of fibroblasts with different morphologies made of an engineered spider silk protein." *Advanced Engineering Materials* **14**(3): B67-B75.
- Lebaron, R. G. und K. A. Athanasiou (2000). "Extracellular matrix cell adhesion peptides: Functional applications in orthopedic materials." *Tissue Engineering* **6**(2): 85-103.
- Lee, J. H., G. Khang, J. W. Lee und H. B. Lee (1998). "Interaction of different types of cells on polymer surfaces with wettability gradient." *Journal of Colloid and Interface Science* **205**(2): 323-330.
- Lensen, M. C., V. A. Schulte, J. Salber, M. Diez, F. Menges und M. Moller (2008). "Cellular responses to novel, micropatterned biomaterials." *Pure and Applied Chemistry* **80**(11): 2479-2487.
- Lewis, R. V., M. Hinman, S. Kothakota und M. J. Fournier (1996). "Expression and purification of a spider silk protein: A new strategy for producing repetitive proteins." *Protein Expression and Purification* **7**(4): 400-406.
- Liebmman, B., D. Huemmerich, T. Scheibel und M. Fehr (2008). "Formulation of poorly water-soluble substances using self-assembling spider silk protein." *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **331**(1-2): 126-132.
- Lintz, E. S. und T. R. Scheibel (2013). "Dragline, egg stalk and byssus: A comparison of outstanding protein fibers and their potential for developing new materials." *Advanced Functional Materials* **23**(36): 4467-4482.
- Liu, T. L., J. C. Miao, W. H. Sheng, Y. F. Xie, Q. Huang, Y. B. Shan und J. C. Yang (2010). "Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing." *Journal of Zhejiang University-Science B* **11**(1): 10-16.

- Liu, Y., Z. Shao und F. Vollrath (2005). "Relationships between supercontraction and mechanical properties of spider silk." *Nature Materials* **4**(12): 901-905.
- Luo, B. H., C. V. Carman und T. A. Springer (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." *Annual Review of Immunology* **25**: 619-647.
- Madsen, B., Z. Z. Shao und F. Vollrath (1999). "Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual." *International Journal of Biological Macromolecules* **24**(2-3): 301-306.
- Mas-Moruno, C., P. M. Dorfner, F. Manzenrieder, S. Neubauer, U. Reuning, R. Burgkart und H. Kessler (2013). "Behavior of primary human osteoblasts on trimmed and sandblasted Ti6Al4V surfaces functionalized with integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3-selective cyclic RGD peptides." *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **101**(1): 87-97.
- Mas-Moruno, C., F. Rechenmacher und H. Kessler (2010). "Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation." *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry* **10**(10): 753-768.
- Massia, S. P. und J. A. Hubbell (1991). "An RGD spacing of 440nm is sufficient for integrin  $\alpha$ -V- $\beta$ -3-mediated fibroblast spreading and 140nm for focal contact and stress fiber formation." *Journal of Cell Biology* **114**(5): 1089-1100.
- Mello, C. M., J. W. Soares, S. Arcidiacono und M. M. Butlers (2004). "Acid extraction and purification of recombinant spider silk proteins." *Biomacromolecules* **5**(5): 1849-1852.
- Menassa, R., Z. Hong, C. N. Karatzas, A. Lazaris, A. Richman und J. Brandle (2004). "Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production." *Plant Biotechnology Journal* **2**(5): 431-438.
- Metwalli, E., U. Slotta, C. Darko, S. V. Roth, T. Scheibel und C. M. Papadakis (2007). "Structural changes of thin films from recombinant spider silk proteins upon post-treatment." *Applied Physics a-Materials Science & Processing* **89**(3): 655-661.
- Meyle, J., K. Gultig und W. Nisch (1995). "Variation in contact guidance by human-cells on a microstructured surface." *Journal of Biomedical Materials Research* **29**(1): 81-88.
- Meyle, J., H. Wolburg und A. F. von Recum (1993). "Surface micromorphology and cellular interactions." *Journal of Biomaterials Applications* **7**(4): 362-374.
- Mieszawska, A. J., L. D. Nadkarni, C. C. Perry und D. L. Kaplan (2010). "Nanoscale control of silica particle formation via silk-silica fusion proteins for bone regeneration." *Chemistry of Materials* **22**(20): 5780-5785.

- Morgan, A. W., K. E. Roskov, S. Lin-Gibson, D. L. Kaplan, M. L. Becker und C. G. Simon (2008). "Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation." *Biomaterials* **29**(16): 2556-2563.
- Moser, M., K. R. Legate, R. Zent und R. Fassler (2009). "The tail of integrins, talin, and kindlins." *Science* **324**(5929): 895-899.
- Motriuk-Smith, D., A. Smith, C. Y. Hayashi und R. V. Lewis (2005). "Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins." *Biomacromolecules* **6**(6): 3152-3159.
- Muller, C., A. Luders, W. Hoth-Hannig, M. Hannig und C. Ziegler (2010). "Initial bioadhesion on dental materials as a function of contact time, pH, surface wettability, and isoelectric point." *Langmuir* **26**(6): 4136-4141.
- Nova, A., S. Keten, N. M. Pugno, A. Redaelli und M. J. Buehler (2010). "Molecular and nanostructural mechanisms of deformation, strength and toughness of spider silk fibrils." *Nano Letters* **10**(7): 2626-2634.
- Numata, K. und D. L. Kaplan (2010). "Silk-based gene carriers with cell membrane destabilizing peptides." *Biomacromolecules* **11**(11): 3189-3195.
- Numata, K., A. J. Mieszawska-Czajkowska, L. A. Kvenvold und D. L. Kaplan (2012). "Silk-based nanocomplexes with tumor-homing peptides for tumor-specific gene delivery." *Macromolecular Bioscience* **12**(1): 75-82.
- Numata, K., B. Subramanian, H. A. Currie und D. L. Kaplan (2009). "Bioengineered silk protein-based gene delivery systems." *Biomaterials* **30**(29): 5775-5784.
- Papadopoulos, P., J. Solter und F. Kremer (2009). "Hierarchies in the structural organization of spider silk-a quantitative model." *Colloid and Polymer Science* **287**(2): 231-236.
- Partis, M. D., D. G. Griffiths, G. C. Roberts und R. B. Beechey (1983). "Cross-linking of protein by omega-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters." *Journal of Protein Chemistry* **2**(3): 263-277.
- Pierschbacher, M. D. und E. Ruoslahti (1984). "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule." *Nature* **309**(5963): 30-33.
- Platnick, N. I. (2014). "The world spider catalog, version 14.5." *American Museum of Natural History*.
- Plow, E. F., T. K. Haas, L. Zhang, J. Loftus und J. W. Smith (2000). "Ligand binding to integrins." *Journal of Biological Chemistry* **275**(29): 21785-21788.

- Plow, E. F., M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G. A. Marguerie und M. H. Ginsberg (1985). "The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **82**(23): 8057-8061.
- Polanski, J., P. Freed, T. Wasfie, A. Kantrowitz, F. Vaughan, L. Bernstam, R. Gray und I. Bernstein (1983). "Inhibition of epithelial downgrowth on percutaneous access devices in swine." *Transactions - American Society for Artificial Internal Organs* **29**: 569-573.
- Pretzl, M., A. Schweikart, C. Hanske, A. Chiche, U. Zettl, A. Horn, A. Boker und A. Fery (2008). "A lithography-free pathway for chemical microstructuring of macromolecules from aqueous solution based on wrinkling." *Langmuir* **24**(22): 12748-12753.
- Prince, J. T., K. P. Mcgrath, C. M. Digirolamo und D. L. Kaplan (1995). "Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk." *Biochemistry* **34**(34): 10879-10885.
- Pritchard, E. M., T. Valentin, D. Boison und D. L. Kaplan (2011). "Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release." *Biomaterials* **32**(3): 909-918.
- Qin, D., Y. N. Xia und G. M. Whitesides (2010). "Soft lithography for micro- and nanoscale patterning." *Nature Protocols* **5**(3): 491-502.
- Rabotyagova, O. S., P. Cebe und D. L. Kaplan (2011). "Protein-based block copolymers." *Biomacromolecules* **12**(2): 269-289.
- Rammensee, S., D. Huemmerich, K. D. Hermanson, T. Scheibel und A. R. Bausch (2006). "Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk." *Applied Physics a-Materials Science & Processing* **82**(2): 261-264.
- Rammensee, S., U. Slotta, T. Scheibel und A. R. Bausch (2008). "Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **105**(18): 6590-6595.
- Ranieri, J. P., R. Bellamkonda, E. J. Bekos, T. G. Vargo, J. A. Gardella und P. Aebischer (1995). "Neuronal cell attachment to fluorinated ethylene-propylene films with covalently immobilized laminin oligopeptides Yigrs and Ikvav 2." *Journal of Biomedical Materials Research* **29**(6): 779-785.
- Rathore, O. und D. Y. Sogah (2001). "Nanostructure formation through beta-sheet self-assembly in silk-based materials." *Macromolecules* **34**(5): 1477-1486.
- Riekell, C., M. Muller und F. Vollrath (1999). "In situ X-ray diffraction during forced silking of spider silk." *Macromolecules* **32**(13): 4464-4466.

- Riekel, C. und F. Vollrath (2001). "Spider silk fibre extrusion: combined wide- and small-angle X-ray microdiffraction experiments." *International Journal of Biological Macromolecules* **29**(3): 203-210.
- Rising, A., G. Hjalmar, W. Engstrom und J. Johansson (2006). "N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindrical spider silk proteins." *Biomacromolecules* **7**(11): 3120-3124.
- Rising, A., H. Nimmervoll, S. Grip, A. Fernandez-Arias, E. Storckenfeldt, D. P. Knight, F. Vollrath und W. Engstrom (2005). "Spider silk proteins - Mechanical property and gene sequence." *Zoological Science* **22**(3): 273-281.
- Roach, P., D. Eglin, K. Rohde und C. C. Perry (2007). "Modern biomaterials: a review-bulk properties and implications of surface modifications." *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **18**(7): 1263-1277.
- Römer, L. und T. Scheibel (2008). "The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber." *Prion* **2**(4): 154-161.
- Ruardy, T. G., J. M. Schakenraad, H. C. Vandermei und H. J. Busscher (1995). "Adhesion and spreading of human skin fibroblasts on physicochemically characterized gradient surfaces." *Journal of Biomedical Materials Research* **29**(11): 1415-1423.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." *Annual review of cell and developmental biology* **12**: 697-715.
- Ruoslahti, E. und M. D. Pierschbacher (1987). "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins." *Science* **238**(4826): 491-497.
- Saneinejad, S. und M. S. Shoichet (1998). "Patterned glass surfaces direct cell adhesion and process outgrowth of primary neurons of the central nervous system." *Journal of Biomedical Materials Research* **42**(1): 13-19.
- Schacht, K. und T. Scheibel (2011). "Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein." *Biomacromolecules* **12**(7): 2488-2495.
- Schaffner, P. und M. M. Dard (2003). "Structure and function of RGD peptides involved in bone biology." *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**(1): 119-132.
- Scheibel, T. (2004). "Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins." *Microbial Cell Factories* **3**(1): 14.
- Schmidt, M., L. Romer, M. Strehle und T. Scheibel (2007). "Conquering isoleucine auxotrophy of *Escherichia coli* BLR(DE3) to recombinantly produce spider silk proteins in minimal media." *Biotechnology Letters* **29**(11): 1741-1744.

- Shattil, S. J., C. Kim und M. H. Ginsberg (2010). "The final steps of integrin activation: the end game." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**(4): 288-300.
- Shimaoka, M. und T. A. Springer (2004). "Therapeutic antagonists and the conformational regulation of the beta2 integrins." *Current topics in medicinal chemistry* **4**(14): 1485-1495.
- Shin, H., S. Jo und A. G. Mikos (2003). "Biomimetic materials for tissue engineering." *Biomaterials* **24**(24): 4353-4364.
- Simmons, A. H., C. A. Michal und L. W. Jelinski (1996). "Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk." *Science* **271**(5245): 84-87.
- Sletten, E. M. und C. R. Bertozzi (2009). "Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality." *Angewandte Chemie International Edition* **48**(38): 6974-6998.
- Slotta, U., S. Hess, K. Spiess, T. Stromer, L. Serpell und T. Scheibel (2007). "Spider silk and amyloid fibrils: A structural comparison." *Macromolecular Bioscience* **7**(2): 183-188.
- Slotta, U., M. Tammer, F. Kremer, P. Koelsch und T. Scheibel (2006). "Structural analysis of spider silk films." *Supramolecular Chemistry* **18**(5): 465-471.
- Slotta, U. K., S. Rammensee, S. Gorb und T. Scheibel (2008). "An engineered spider silk protein forms microspheres." *Angewandte Chemie-International Edition* **47**(24): 4592-4594.
- Smith, A. und T. Scheibel (2013). CHAPTER 12 Hierarchical Protein Assemblies as a Basis for Materials. *Materials Design Inspired by Nature: Function Through Inner Architecture*, The Royal Society of Chemistry: 256-281.
- Sofia, S., M. B. McCarthy, G. Gronowicz und D. L. Kaplan (2001). "Functionalized silk-based biomaterials for bone formation." *Journal of Biomedical Materials Research* **54**(1): 139-148.
- Spiess, K., R. Ene, C. D. Keenan, J. Senker, F. Kremer und T. Scheibel (2011). "Impact of initial solvent on thermal stability and mechanical properties of recombinant spider silk films." *Journal of Materials Chemistry* **21**(35): 13594-13604.
- Spiess, K., S. Wohlrab und T. Scheibel (2010). "Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films." *Soft Matter* **6**(17): 4168-4174.
- Sponner, A., W. Vater, S. Monajembashi, E. Unger, F. Grosse und K. Weisshart (2007). "Composition and hierarchical organisation of a spider silk." *PloS one* **2**(10): e998.

- Sutherland, T. D., S. Weisman, A. A. Walker und S. T. Mudie (2012). "Invited review the coiled coil silk of bees, ants, and hornets." *Biopolymers* **97**(6): 446-454.
- Suzuki, S., A. Oldberg, E. G. Hayman, M. D. Pierschbacher und E. Ruoslahti (1985). "Complete amino acid sequence of human vitronectin deduced from cDNA. Similarity of cell attachment sites in vitronectin and fibronectin." *The EMBO journal* **4**(10): 2519-2524.
- Szabo, I., S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J. L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini und M. Zoratti (1999). "Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity." *Embo Journal* **18**(20): 5517-5527.
- Szela, S., P. Avtges, R. Valluzzi, S. Winkler, D. Wilson, D. Kirschner und D. L. Kaplan (2000). "Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk." *Biomacromolecules* **1**(4): 534-542.
- Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz und T. A. Springer (2002). "Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling." *Cell* **110**(5): 599-511.
- Tamada, Y. und Y. Ikada (1994). "Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen." *Journal of Biomedical Materials Research* **28**(7): 783-789.
- Tang, C., F. Kligman, C. C. Larsen, K. Kottke-Marchant und R. E. Marchant (2009). "Platelet and endothelial adhesion on fluorosurfactant polymers designed for vascular graft modification." *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **88**(2): 348-358.
- Teixeira, A. I., G. A. Abrams, P. J. Bertics, C. J. Murphy und P. F. Nealey (2003). "Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates." *Journal of Cell Science* **116**(Pt 10): 1881-1892.
- Teulé, F., A. R. Cooper, W. A. Furin, D. Bittencourt, E. L. Rech, A. Brooks und R. V. Lewis (2009). "A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning." *Nature Protocols* **4**(3): 341-355.
- Teule, F., W. A. Furin, A. R. Cooper, J. R. Duncan und R. V. Lewis (2007). "Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers." *Journal of Materials Science* **42**(21): 8974-8985.
- Thiel, B. L. und C. Viney (1996). "Beta sheets and spider silk." *Science* **273**(5281): 1480-1481.
- Tien, L. W., E. S. Gil, S. H. Park, B. B. Mandal und D. L. Kaplan (2012). "Patterned silk film scaffolds for aligned lamellar bone tissue engineering." *Macromolecular Bioscience* **12**(12): 1671-1679.

- Tillinghast, E. K. und M. A. Townley (1994). "Silk glands of Araneid spiders -selected morphological and physiological-aspects." *Silk Polymers* **544**: 29-44.
- Torbet, J., M. Malbouyres, N. Builles, V. Justin, M. Roulet, O. Damour, A. Oldberg, F. Ruggieo und D. J. S. Hulmes (2007). "Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction." *Biomaterials* **28**(29): 4268-4276.
- van Beek, J. D., S. Hess, F. Vollrath und B. H. Meier (2002). "The molecular structure of spider dragline silk: Folding and orientation of the protein backbone." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**(16): 10266-10271.
- van der Flier, A. und A. Sonnenberg (2001). "Function and interactions of integrins." *Cell and Tissue Research* **305**(3): 285-298.
- Vendrely, C., C. Ackerschott, L. Roemer und T. Scheibel (2008). "Molecular design of performance proteins with repetitive sequences: Recombinant flagelliform spider silk as basis for biomaterials." *Methods in Molecular Biology* **474**: 3-14.
- Vendrely, C. und T. Scheibel (2007). "Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications." *Macromolecular Bioscience* **7**(4): 401-409.
- Vollrath, F. und D. P. Knight (2001). "Liquid crystalline spinning of spider silk." *Nature* **410**(6828): 541-548.
- Vollrath, F. und D. Porter (2006). "Spider silk as archetypal protein elastomer." *Soft Matter* **2**(5): 377-385.
- Wang, F., Y. Li, Y. Shen, A. Wang, S. Wang und T. Xie (2013). "The functions and applications of RGD in tumor therapy and tissue engineering." *International Journal of Molecular Sciences* **14**(7): 13447-13462.
- Wang, X. Y., X. Hu, A. Daley, O. Rabotyagova, P. Cebe und D. L. Kaplan (2007). "Nanolayer biomaterial coatings of silk fibroin for controlled release." *Journal of Controlled Release* **121**(3): 190-199.
- Weisman, S., S. Okada, S. T. Mudie, M. G. Huson, H. E. Trueman, A. Sriskantha, V. S. Haritos und T. D. Sutherland (2009). "Fifty years later: The sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk." *Journal of Structural Biology* **168**(3): 467-475.
- Weisman, S., H. E. Trueman, S. T. Mudie, J. S. Church, T. D. Sutherland und V. S. Haritos (2008). "An Unlikely Silk: The Composite Material of Green Lacewing Cocoons." *Biomacromolecules* **9**(11): 3065-3069.
- Weiss, P. (1929). "Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am in vitro wachsenden Gewebe." *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* **116**(1): 438-554.



- Weiss, P. (1934). "In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber." *Journal of Experimental Zoology* **68**(3): 393-448.
- Weiss, P. (1945). "Experiments on cell and axon orientation in vitro - the role of colloidal exudates in tissue organization." *Journal of Experimental Zoology* **100**(3): 353-386.
- Widhe, M., U. Johansson, C. O. Hillerdahl und M. Hedhammar (2013). "Recombinant spider silk with cell binding motifs for specific adherence of cells." *Biomaterials* **34**(33): 8223-8234.
- Widmaier, D. M., D. Tullman-Ercek, E. A. Mirsky, R. Hill, S. Govindarajan, J. Minshull und C. A. Voigt (2009). "Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers." *Molecular Systems Biology* **5**: 309.
- Widmaier, D. M. und C. A. Voigt (2010). "Quantification of the physiochemical constraints on the export of spider silk proteins by *Salmonella* type III secretion." *Microbial Cell Factories* **9**: 78.
- Willcox, P. J., S. P. Gido, W. Muller und D. L. Kaplan (1996). "Evidence of a cholesteric liquid crystalline phase in natural silk spinning processes." *Macromolecules* **29**(15): 5106-5110.
- Winkler, S. und D. L. Kaplan (2000). "Molecular biology of spider silk." *Reviews in Molecular Biotechnology* **74**(2): 85-93.
- Winkler, S., S. Szela, P. Avtges, R. Valluzzi, D. A. Kirschner und D. Kaplan (1999). "Designing recombinant spider silk proteins to control assembly." *International Journal of Biological Macromolecules* **24**(2-3): 265-270.
- Wohlrab, S., S. Mueller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egana und T. Scheibel (2012). "Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins." *Biomaterials* **33**(28): 6650-6659.
- Wohlrab, S., K. Spiess und T. Scheibel (2012). "Varying surface hydrophobicities of coatings made of recombinant spider silk proteins." *Journal of Materials Chemistry* **22**(41): 22050-22054.
- Wohlrab, S., C. Thamm und T. Scheibel (2014). The Power of Recombinant Spider Silk Proteins. *Biotechnology of Silk*. T. Asakura und T. Miller, Springer Netherlands. **5**: 179-201.
- Wojciak-Stothard, B., A. Curtis, W. Monaghan, K. MacDonald und C. Wilkinson (1996). "Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography." *Experimental Cell Research* **223**(2): 426-435.

- Wong Po Foo, C., S. V. Patwardhan, D. J. Belton, B. Kitchel, D. Anastasiades, J. Huang, R. R. Naik, C. C. Perry und D. L. Kaplan (2006). "Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **103**(25): 9428-9433.
- Xia, X. X., C. S. Ki, Y. H. Park, D. L. Kaplan und S. Y. Lee (2010). "Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**(32): 14059-14063.
- Xia, Y. N., E. Kim und G. M. Whitesides (1996). "Micromolding of polymers in capillaries: Applications in microfabrication." *Chemistry of Materials* **8**(7): 1558-1567.
- Xiao, T., J. Takagi, B. S. Collier, J. H. Wang und T. A. Springer (2004). "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." *Nature* **432**(7013): 59-67.
- Xu, M. und R. V. Lewis (1990). "Structure of a protein superfiber - spider dragline silk." *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**(18): 7120-7124.
- Young, S. L., M. Gupta, C. Hanske, A. Fery, T. Scheibel und V. V. Tsukruk (2012). "Utilizing conformational changes for patterning thin films of recombinant spider silk proteins." *Biomacromolecules* **13**(10): 3189-3199.
- Zarkoob, S., R. K. Eby, D. H. Reneker, S. D. Hudson, D. Ertley und W. W. Adams (2004). "Structure and morphology of electrospun silk nanofibers." *Polymer* **45**(11): 3973-3977.
- Zeplin, P. H., N. C. Maksimovikj, M. C. Jordan, J. Nickel, G. Lang, A. H. Leimer, L. Römer und T. Scheibel (2014). "Spider silk coatings as a bioshield to reduce periprosthetic fibrous capsule formation." *Advanced Functional Materials* **24**(18): 2658-2666.
- Zhou, C. Z., C. F., M. Jacquet, R. Perasso, Z. G. Li und J. Janin (2001). "Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence." *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **44**(2): 119-122.

## 5 DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS

Die in der vorliegenden Dissertation vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern erzielt und bereits in den unten aufgeführten Journalen veröffentlicht. Nachfolgend werden die einzelnen Beiträge aller Autoren zu den jeweiligen Veröffentlichungen genau angegeben.

- I. **Wohlrab, S.**, Thamm, C., and Scheibel, T. (2014). "The Power of Recombinant Spider Silk Proteins." Biotechnology of Silk. T. Asakura and T. Miller, Springer Netherlands. **5**: 179-201.

Die Konzeption des Artikels wurde von Thomas Scheibel und mir erarbeitet. Das Manuskript wurde von Christopher Thamm und mir verfasst. Thomas Scheibel war in wissenschaftliche Diskussionen eingebunden und an der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

- II. Bauer, F.\*, **Wohlrab, S.\***, and Scheibel, T. (2013). "Controllable cell adhesion, growth and orientation on layered silk protein films." Biomaterials Science **1**(12): 1244-1249.

Alle Zellkulturexperimente wurden von mir durchgeführt. Die glatten Filme wurden von mir produziert. Felix Bauer stellte die strukturierten Filme her und führte die Bildanalyse durch. Das Manuskript wurde von Felix Bauer und mir verfasst und gemeinsam mit Thomas Scheibel fertiggestellt. Thomas Scheibel betreute das Projekt und war an wissenschaftlichen Diskussionen beteiligt.

- III. **Wohlrab, S.\***, Mueller, S.\*, Schmidt, A., Neubauer, S., Kessler, H., Leal-Egana, A., and Scheibel, T. (2012). "Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins." Biomaterials **33**(28): 6650-6659.

Diese Veröffentlichung entstand in Zusammenarbeit mit dem Institute for Advanced Study der TU München. Die chemische Kopplung von c(RGDfK) und c(RGEfK) wurde von mir durchgeführt. Sämtliche Filme wurden von mir hergestellt. FTIR-Messungen, Fourier-Selbstdekonvolution, Kontaktwinkelmessungen und AFM-Analysen wurden von mir durchgeführt. Die CD-Spektroskopie wurde von Susanne Müller durchgeführt. C16SpRGD wurde von Susanne Müller hergestellt. C16SpRGE wurde von Andreas Schmidt produziert. Die Zellkulturexperimente wurden von Aldo Leal-Egana durchgeführt. Die Synthese des Peptids (cRGDfK) wurde von Stefanie Neubauer durchgeführt. Das Manuskript wurde von Susanne Müller verfasst. Thomas Scheibel betreute das Projekt. Horst Kessler und Thomas Scheibel waren an wissenschaftlichen Diskussionen und der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

- IV. **Wohlrab, S.\***, Spiess, K.\*, and Scheibel, T. (2012). "Varying surface hydrophobicities of coatings made of recombinant spider silk proteins." Journal of Materials Chemistry **22**(41): 22050-22054.

Die AFM Messungen, die Kontaktwinkelanalyse, der Verdau mit Chymotrypsin, die FTIR-Messungen und Fourier-Selbstdekonvolution wurden von mir durchgeführt. Die DMA-Analyse wurde von Kristina Spieß angefertigt. Das Manuskript wurde von mir verfasst. Kristina Spieß und Thomas Scheibel waren in die wissenschaftlichen Diskussionen über das Modell der Selbstassemblierung involviert. Thomas Scheibel betreute das Projekt und war an der Fertigstellung des Manuskripts beteiligt.

\* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

## 6 PUBLIKATIONSLISTE

- I. **Wohlrab, S.**, Thamm, C., and Scheibel, T. (2014). "The Power of Recombinant Spider Silk Proteins." Biotechnology of Silk. T. Asakura and T. Miller, Springer Netherlands. **5**: 179-201.
- II. Bauer, F.\*, **Wohlrab, S.\***, and Scheibel, T. (2013). "Controllable cell adhesion, growth and orientation on layered silk protein films." Biomaterials Science **1**(12): 1244-1249.
- III. **Wohlrab, S.\***, Mueller, S.\*, Schmidt, A., Neubauer, S., Kessler, H., Leal-Egana, A., and Scheibel, T. (2012). "Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins." Biomaterials **33**(28): 6650-6659.
- IV. **Wohlrab, S.\***, Spiess, K.\*, and Scheibel, T. (2012). "Varying surface hydrophobicities of coatings made of recombinant spider silk proteins." Journal of Materials Chemistry **22**(41): 22050-22054.
- V. Spiess, K., **Wohlrab, S.**, and Scheibel, T. (2010). "Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films." Soft Matter **6**(17): 4168-4174.

\* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

## 7. TEILARBEITEN

### TEILARBEIT I

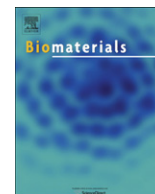
Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in *Biomaterials* veröffentlicht als:

"Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins."

Wohlrab, S. \*, Mueller, S. \*, Schmidt, A., Neubauer, S., Kessler, H., Leal-Egana, A., und  
Scheibel, T.

Reproduziert aus *Biomaterials* **2012**, 33(28): 6650-6659 mit freundlicher Genehmigung des  
Verlages Elsevier.

\* gleichberechtigte Co-Autorenschaft



# Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins

Stefanie Wohlrab<sup>a,1</sup>, Susanne Müller<sup>a,1</sup>, Andreas Schmidt<sup>a</sup>, Stefanie Neubauer<sup>b</sup>, Horst Kessler<sup>b,c</sup>, Aldo Leal-Egaña<sup>a,\*</sup>, Thomas Scheibel<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Lehrstuhl Biomaterialien, Universitätsstraße 30, Universität Bayreuth, D-95447 Bayreuth, Germany

<sup>b</sup> Institute for Advanced Study, Center of Integrated Protein Science, Lichtenbergstr. 4, Technische Universität München, D-85747 Garching, Germany

<sup>c</sup> Chemistry Department, Faculty of Science, King Abdulaziz University, P.O. Box 80203, Jeddah 21589, Saudi Arabia

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 22 February 2012

Accepted 30 May 2012

Available online 22 June 2012

### Keywords:

Silk

Genetic engineering

Chemical coupling

Cell adhesion

Cell proliferation

RGD peptide

## ABSTRACT

Due to the biocompatibility and biodegradability as well as the mechanical properties of the fibers, spider silk has become an attractive material for researchers regarding biomedical applications. In this study, the engineered recombinant spider silk protein eADF4(C16) was modified with the integrin recognition sequence RGD by a genetic (fusing the amino acid sequence GRGDSPG) as well as a chemical approach (using the cyclic peptide c(RGDfK)). Both modified silk proteins were processed into films, and thereafter characterized concerning secondary structure, water contact angle and surface roughness. No influence of the RGD-modifications on any of these film properties could be detected. However, attachment and proliferation of BALB/3T3 mouse fibroblasts were significantly improved on films made of the RGD-modified silk proteins. Interestingly, the genetically created hybrid protein (with a linear RGD sequence) showed similar or slightly better cell adhesion properties as the silk protein chemically modified with the cyclic RGD peptide.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Recently, our knowledge on wound healing has been greatly increased, mediating the development of new materials for wound coverage and tissue engineering. In tissue engineering materials have been used of natural origin including collagen, chitosan, silk, hyaluronan and fibrin as well as synthetic biodegradable polymers such as polyurethanes, polyesters (polyglycolide (PGA), polylactic acid (PLA)), polyethylene oxide (PEO) or polyvinyl alcohol [1].

For biomaterial applications the interaction of a material's surface with cells is of critical importance. It determines cell attachment, as well as the spreading behavior, proliferation and differentiation. The interaction strongly depends on the physico-chemical properties of the surface, such as its hydrophilicity, roughness, or presence of functional groups, its microstructure and mechanical properties [2]. However, the affinity of cells for certain surfaces differs depending on the cell type. Fibroblasts, for example, prefer surfaces with an intermediate wettability [3], whereas osteoblasts favor highly hydrophilic surfaces [4]. Several tools have been investigated to improve the interaction between cells and

biomaterials. One way of promoting cell attachment is to change the morphology of the material, for example by introducing pores (as in foams or non-woven mats) or by employing patterned surfaces [5,6]. Another strategy is to chemically modify the surface, e.g. by plasma treatment, functionalization with chemical functional moieties like amine, carboxyl, hydroxyl or carbonyl groups, or by grafting of polymers onto the surface, for instance poly-acrylic acid or chitosan [7,8]. Furthermore, immobilization of biomolecules such as growth factors or cell adhesive peptides (e.g. containing the sequence RGD) has been shown to increase cell affinity [9–11]. RGD peptides originate from sequences of fibronectin and vitronectin, proteins of the extracellular matrix acting as integrin ligands. RGD peptides have been coupled to diverse biomaterials like hyaluronan and PEG-based hydrogels, titanium implants, polyurethane and PDMS surfaces [12–16]. Also various recombinant silk proteins have been genetically modified with RGD domains [17–20]. A wide variety of different RGD peptides has been employed, ranging from the minimal recognition sequence RGD to GRGDS, GRGDY or longer variants like RGDSPASSKP or Ac-CGGNGEPRGDYRAY-NH<sub>2</sub>. Cyclic RGD peptides were identified to show even higher affinity and receptor selectivity for integrins than linear ones [21–24], and they can be designed to optimally address the integrin subtype of interest [25].

Spider silk reflects a promising material for biomedical applications, due to its biocompatibility, biodegradability and mechanical properties of the silk fibers [26]. Spider webs were already used

\* Corresponding authors. Fax: +49 (0) 921 55 7346.

E-mail addresses: [aldo.leal@bm.uni-bayreuth.de](mailto:aldo.leal@bm.uni-bayreuth.de) (A. Leal-Egaña), [thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de](mailto:thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de) (T. Scheibel).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

by ancient Greeks to cover wounds and stop bleeding [27]. Although showing good properties, industrial use of spider silk is hampered by the cannibalistic behavior of spiders and therefore a limited availability. We, amongst others, established recombinant production of spider silk proteins in *Escherichia coli* [28–31]. One of the recombinantly produced proteins is eADF4(C16) based on one of three major ampullate spidroins (MaSp) of the dragline silk of the European garden spider (*Araneus diadematus*). This recombinant silk protein consists of 16 repeats of a consensus (C-)module, mimicking the repetitive core domain of native ADF4 of *A. diadematus* (Fig. 1).

eADF4(C16) can be transformed into various morphologies such as films [32,33], particles [34,35], capsules [36], hydrogels [37] or non-woven mats [5]. Apart from organic solvents, eADF4(C16) can be processed from aqueous solutions under ambient conditions [38], which contributes to its suitability as a biomaterial.

Recently, we observed low adhesion and a lack of proliferation of BALB/3T3 mouse fibroblasts on eADF4(C16) films [5], which is not uncommon for silk protein matrices [39,40], reflecting a drawback for certain applications in tissue engineering. Therefore, the aim of this study was to improve cell adhesion and proliferation by creating a chemically or genetically modified variant of the protein containing the RGD sequence. While genetic approaches only allow the introduction of linear RGD domains, chemical functionalization enables coupling of cyclic RGD peptides. Here, we directly compared both approaches and their impact on cell binding and proliferation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Production of eADF4 (C16)

The recombinant spider silk protein eADF4(C16) is based on the consensus sequence of one of three spidroins of the dragline silk of the European garden

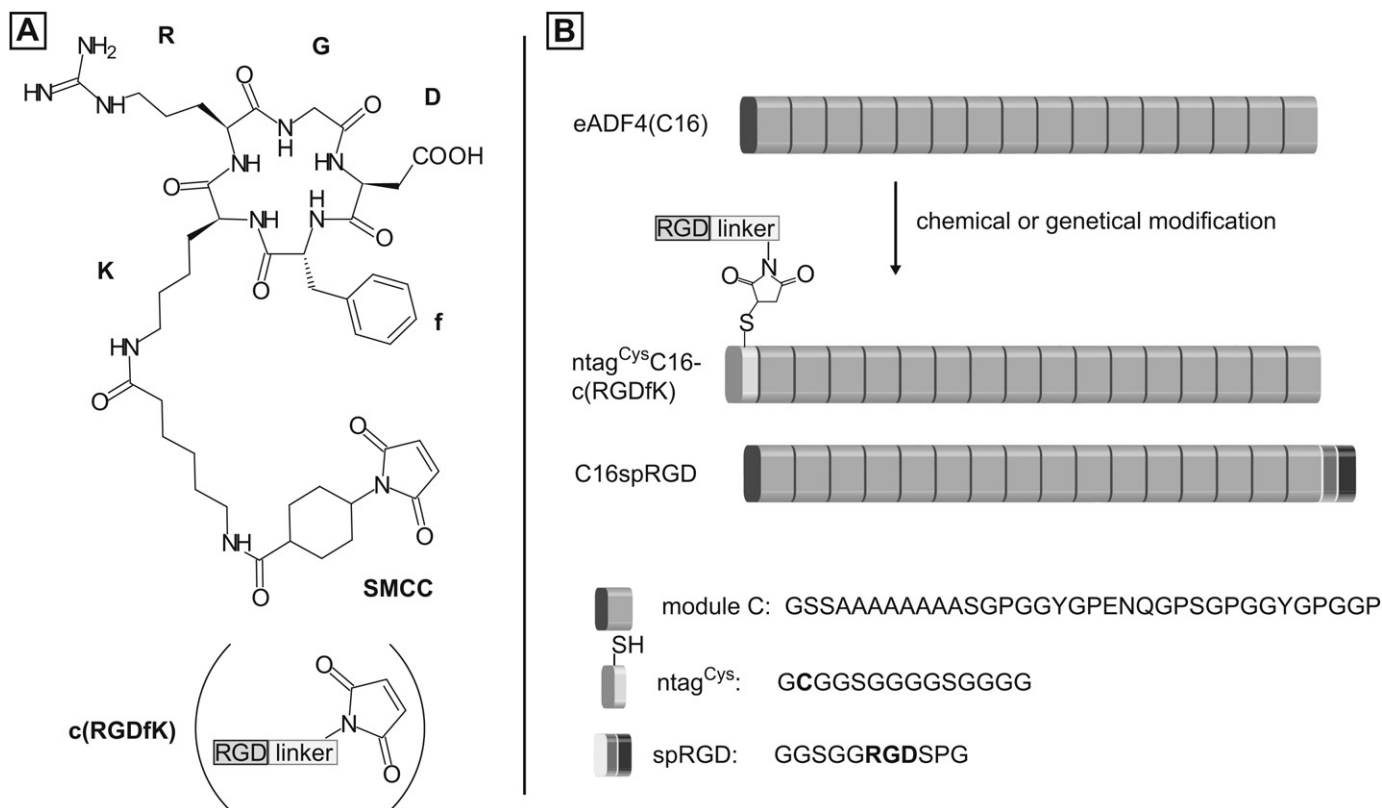
spider (*A. diadematus*). The consensus motif (C-module) of ADF4 (GSSAAAAAASGPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGP) is repeated 16 times in the recombinant protein (Fig. 1B). For detection, an N-terminal T7-tag is fused to the molecule. Production in *E. coli* and purification was performed as described by Huennerich et al. [28]. Briefly, for the purification of eADF4(C16), cells were incubated in 50 mM Tris/HCl 100 mM NaCl buffer, pH 7.5 containing 0.2 mg/ml lysozyme at 4 °C for 30 min and lysed by ultrasonication. After centrifugation of cell fragments, soluble *E. coli* proteins were precipitated by heat denaturation at 80 °C for 20 min and removed by centrifugation. Silk proteins remained soluble and were salted out with 20% ammonium sulfate at room temperature (RT).

### 2.2. Genetic modification of eADF4 (C16)

DNA cassettes encoding RGD and a spacer sequence were created by annealing two synthetic oligo-nucleotides. For the RGD-tag GATCCATGGGCGGTCTGGTG ACTCTCCGGTTAATGAA and AGCTTTCATTAACCCGAGAGTACCACGCCCATG and for the spacer sequence GATCCATGGGCGGTGGCTCTGGTTAATGAA and AGCTTTCATTAACCCGAGAGTACCACGCCCATG were used. The resulting amino acid sequence for the specific tag spRGD was GSGGGRGDSPG (Fig. 1B). The insertion of the DNA sequences into the cloning vector and the ligation with the gene encoding eADF4(C16) were accomplished by a seamless cloning strategy as described previously [28].

The gene encoding the RGE control silk protein was created by PCR-based site-directed mutagenesis using the plasmid pET29-C16spRGD as a template. The triplet GAC encoding Asp was changed to GAG encoding Glu by employing the forward primer GCTCTGGCGGTCTGGTGAGTCTCCGGTTAATG and the reverse primer GCTTTCATTAACCCGAGACTACCAACGACC (the mutated base pair is underlined). 80 ng of vector DNA, 100 nM of each of the two primers, 200 μM of dNTPs, 1.25 U *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, Madison, Wisconsin, USA), 5 μl of 10× reaction buffer (200 mM Tris/HCl (pH 8.8), 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton® X-100, 1 mg/ml BSA) were mixed in a total volume of 50 μl. PCR amplification parameters: incubation at 95 °C for 95 s, followed by 25 cycles at 95 °C for 45 s, 64 °C for 30 s, and 68 °C for 7.5 min. The PCR product was purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA), and the template DNA was digested by *DpnI* at 37 °C for 60 min.

The DNA sequences of the genetically engineered C16spRGD and of C16spRGE were confirmed by sequencing. Protein production and purification procedures were identical to that of eADF4(C16).



**Fig. 1.** A: Chemical structure of the synthetic cyclic RGD peptide c(RGDfK) employed for chemical modification of ntag<sup>Cys</sup>C16. B: eADF4(C16) and the RGD-containing variants ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) (chemically modified) and C16spRGD (genetically modified). For ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK), c(RGDfK) was covalently coupled to the thiol group of a cysteine residue of ntag<sup>Cys</sup>C16 [33]. C16spRGD was modified by genetic engineering hybridizing a spacer and an RGD domain with eADF4(C16).



### 2.3. Chemical coupling of RGD to a cysteine-modified variant of eADF4(C16)

For high coupling specificity, chemical coupling of RGD peptides was performed with the cysteine containing eADF4(C16) variant ntag<sup>Cys</sup>C16 which has been previously established [33] (Fig. 1B). For coupling of the cyclic RGD c(RGDfk) [22–24] (Fig. 1A) and the control peptide c(RGEfk) (Peptides International, Louisville, Kentucky, USA), lyophilized ntag<sup>Cys</sup>C16 was dissolved in 6 M guanidinium thiocyanate (GdmSCN), dialyzed against 20 mM HEPES, pH 7, and diluted to a final concentration of 2 mg/mL. For reduction of disulfide bonds, proteins were incubated in a tenfold excess of tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) for 2 h at RT. After addition of a 20 fold excess of c(RGDfk) or c(RGEfk), the reaction of maleimide and free thiol groups was carried out for 2 h at RT. The proteins were purified by precipitation with potassium phosphate (pH 8) at a final concentration of 1 M, followed by washing the pellet three times with deionized water.

### 2.4. Silk film fabrication

Lyophilized silk proteins were dissolved in 6 M GdmSCN and dialyzed against 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.5. After centrifugation (55000 rpm, 1 h) the supernatant was diluted to 2 mg/mL. Films were prepared by casting the protein solution on polystyrene petri dishes (for FTIR, AFM and contact angle measurements) or into non-treated cell culture plates (Nunc, Langenselbold, Germany) (for cell culture experiments). For each film 0.5 mg protein per cm<sup>2</sup> were used. Samples were placed in a climate chamber (Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) at 25 °C and a relative humidity of 30%. Post-treatment was performed with ethanol (100%, p.a.) in the climate chamber under identical conditions.

### 2.5. Mass spectrometry (MS)

Silk proteins were dissolved in 6 M GdmSCN and dialyzed against 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.5. Samples were prepared by adding matrix solution (sinapinic acid, 20 mg/mL in acetonitrile, 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O). Additionally, proteins were digested with Glu-C (Promega, Madison, USA) by mixing 50 µg of dissolved protein with 5 µL Glu-C (0.1 mg/mL) in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.5, and incubating at 25 °C over night. Samples were prepared by adding matrix solution ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, 10 mg/mL in acetonitrile, 0.1% TFA in H<sub>2</sub>O). MALDI-TOF MS was performed on a Bruker Reflex III (Bruker, Bremen, Germany) equipped with a 337 nm N<sub>2</sub> laser in linear mode and 20 kV acceleration voltage.

### 2.6. Circular dichroism (CD) spectroscopy

Proteins were dissolved in 6 M GdmSCN and dialyzed against 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.5. CD spectra were collected on a Jasco J-815 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) in a 0.1 cm cell at 20 °C. For each spectrum 3 scans were accumulated at 50 nm/min.

### 2.7. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy

FTIR spectra of silk films were recorded on a Bruker Tensor 27 spectrometer (Bruker, Bremen, Germany). Silk films were placed on a Ge crystal for measuring IR spectra by attenuated total reflection with a resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. For each spectrum 60 scans were averaged. The amide I band (1590–1720 cm<sup>-1</sup>) was further analyzed by Fourier self-deconvolution (FSD) to determine individual secondary structure elements by assigning the bands according to Hu et al., 2006 [41].

### 2.8. Contact angle measurements

Water contact angles on post-treated silk films were measured by the static sessile drop method using a DataPhysica OCA instrument (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Germany). After setting a baseline at the liquid–solid interface, contact angles were determined by a Laplace Young Fit using the SCA20 software. For each film at least five drops were measured.

### 2.9. Atomic force microscopy (AFM)

The surface morphology of ethanol-treated silk films was analyzed by AFM using a Dimension™ 3100 NanoScope IV (Veeco Instrument Inc., N.Y., USA). Measurements were performed in tapping mode with a Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> cantilever (Olympus, Tokyo, Japan, force constant of 42 N/m). Average roughness R<sub>a</sub> was calculated in an area of 25 µm<sup>2</sup>.

### 2.10. Cell culture

BALB/3T3 mouse fibroblasts (European Collection of Cell Cultures) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1.0% v/v GlutaMAX (Gibco, Grand Island, USA) and 0.1% v/v Gentamicin sulfate (Sigma–Aldrich, Seelze, Germany). Viability of the cells was confirmed with trypan blue (Sigma–Aldrich, Ayrshire, UK) before seeding on the different surfaces. Cells

were maintained in an incubator (Haereus, Hanau, Germany) at 37 °C with a controlled atmosphere of 5.0% CO<sub>2</sub> and at 95% relative humidity.

### 2.11. Analysis of cell adhesion and proliferation

For cell culture experiments all silk films were cast on non-treated cell culture plates (polystyrene plates) (Nunc, Langenselbold, Germany). In control experiments (good cell adhesion) cells were seeded on treated cell culture plates (Nunc, Langenselbold, Germany) as well as on fibronectin-coated cell culture plates (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA). Cells were further seeded on non-treated cell culture plates as a control for weak cell adhesion.

For analysis of cell adhesion, 75000 cells/cm<sup>2</sup> were seeded in single wells of a 48 well plate and incubated for 1.5 h. Then, cells were washed once with Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) to remove non-adherent or dead fibroblasts, followed by addition of fresh medium. After incubation for 2.5 h in presence of 10% v/v CellTiter-Blue reagent® (Promega, Madison, USA) the number of attached cells was determined. Therefore, the transformation of the blue, non-fluorescent dye resazurin into the red, fluorescent resorufin ( $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ) was measured spectroscopically in a plate reader (Mithras LB 940, Berthold, Bad Wildbad, Germany) using 530 nm excitation and 600 nm emission filters with a counting time of 0.5 s. For the different surfaces cell adhesion experiments were repeated 2–4 times with 8 replicates each time.

Cell proliferation assays were carried out in 48 well plates with an initial cell density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> for 6 days. Once a day the medium was changed and the CellTiter Blue assay was performed. Afterward, the cell culture medium was changed again, and cells were maintained in the incubator with controlled atmosphere. Since the cell-titer blue reagent is not toxic for continuous analysis, it can be repeated several times within the same culture over the entire period of examination. For the different surfaces proliferation experiments were repeated 2–3 times with 8 replicates each time.

### 2.12. Analysis of proliferation rate and doubling time

The proliferation rate ( $\mu$ ) and doubling time ( $T_d$ ) were determined by employing a first order Monod-type kinetic model [42], with the assumption that the mortality rate can be disregarded (equation (1))

$$X(t) = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

with  $X(t)$  and  $X_0$  being the concentration of viable cells at time point  $t$  and 0, respectively. The calculation of  $\mu$  from the fluorescence intensities at the various time points has been previously described in detail [5]. The doubling time can be calculated according to

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

### 2.13. Staining of live cells

For analysis of cell morphology, cells were seeded in 48 well plates with an initial cell density of 5000 cells/cm<sup>2</sup>. After 1, 3 and 6 days of cultivation, cells were stained with Calcein acetoxymethyl ester (Calcein A/M) (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Calcein A/M was added to the medium at a final concentration of 2 µM, and cells were incubated for 10 min at 37 °C. Live cells were visualized with a Leica DMI3000 B fluorescence microscope (Leica, Wetzlar, Germany).

### 2.14. Statistical analysis

Analysis of fluorescence intensities was accomplished by one-way analysis of variance (ANOVA) after incubation of the cells on the different surfaces for 1.5 h. The pairwise comparison of the means was performed with the Tukey test (*post hoc* comparison).  $P$ -values < 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Protein modifications

The identity of the RGD and RGE-modified variants could be verified by MALDI-TOF MS (Fig. 2A,B). Mostly, the N-terminal methionine residues of the T7-tag were deleted in the recombinant proteins, a phenomenon not un-common for bacterial protein synthesis [43].

The functionalization of the thiol group of engineered cysteines in ntag<sup>Cys</sup>C16 has been previously analyzed in detail [33]. Successful chemical coupling of c(RGDfk) and c(RGEfk) to ntag<sup>Cys</sup>C16 was monitored by MALDI-TOF MS, indicating that in both cases the

majority of the protein was successfully modified (Fig. 2C and D). Only small amounts of non-modified ntag<sup>Cys</sup>C16 (theoretical mass of 48564 Da) could be detected, in accordance with the previously observed coupling efficiency of 70–90% [33].

Due to the size of the proteins, the recorded masses of the full-length proteins are not accurate. Therefore, we further digested the proteins with Glu-C prior to mass analysis. The enzyme hydrolyzes the recombinant silk proteins once in a C-module yielding 17 fragments. The shorter fragments allow an improved resolution of the mass spectra, and the exact masses of the termini could be determined, verifying the integrity of the N- and C-terminal tags (see Supplementary Table S1).

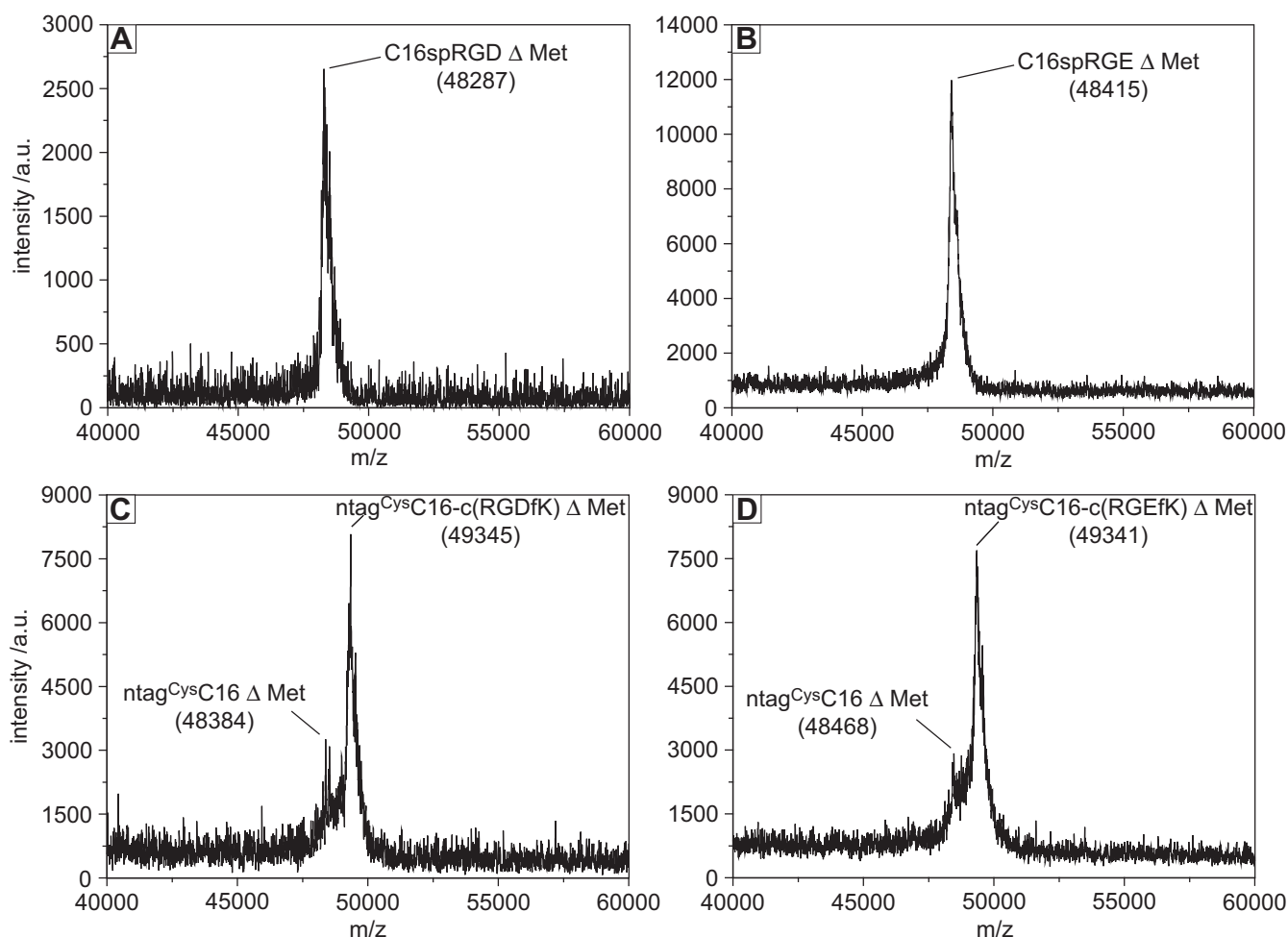
### 3.2. Structural characterization of eADF4(C16)-RGD variants in solution and in films

The RGD-modified silk proteins were compared to eADF4(C16) regarding their conformation in solution and after film formation, in order to investigate putative influences of the modifications on either structure or assembly behavior. Secondary structure analysis of soluble silk proteins was performed by CD spectroscopy, indicating that eADF4(C16) as well as the RGD variants showed almost identical CD spectra with minima at about 200 nm (Fig. 3), typical for a mainly random coil or polyproline II-like conformation.

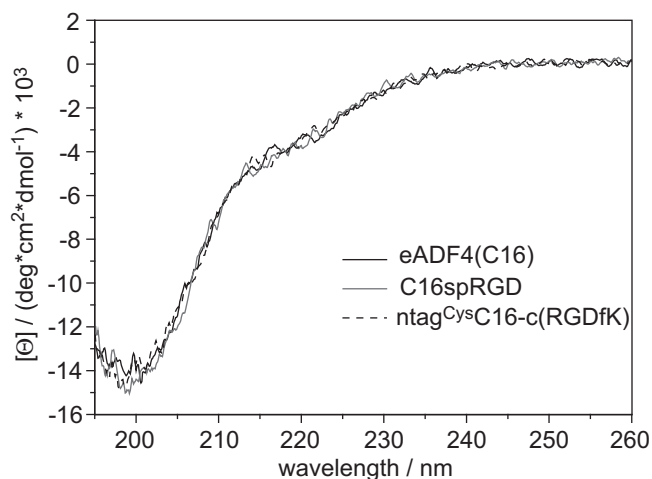
Silk protein films were cast from ammonium bicarbonate buffered solutions and air dried under controlled conditions. Ammonium bicarbonate decomposes into volatile components (NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>O) upon evaporation and thus does not crystallize in or on the silk films [44]. FTIR spectra were recorded before and after treatment of the films with ethanol (i.e. post-treatment) (Fig. 4). Fourier self-deconvolution (FSD) of the amide I band allowed assignment of individual secondary structure elements (Table 1). C16spRGD as well as ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) films were indistinguishable from unmodified eADF4(C16) concerning their secondary structure composition. As-cast films predominantly showed random coil structures (36%). Post-treatment using primary alcohols or kosmotropic ions (like potassium phosphate) renders water-soluble silk films water-insoluble (by inducing  $\beta$ -sheet formation) [38,45–47]. Here, incubation with ethanol increased the  $\beta$ -sheet content from approximately 20% to about 40% at the expense of  $\alpha$ -helical, random coil, and  $\beta$ -turn structures, which is in good agreement with results obtained in previous studies [32,33,44,48]. Again, there was no detectable structural effect of the RGD tag independent of the way of coupling after post-treatment of the films.

### 3.3. Surface properties of ethanol-treated silk films

Attachment of cells to surfaces is strongly dependent on surface properties including wettability [4], porosity [49], roughness [50]



**Fig. 2.** MALDI-TOF mass spectra A: C16spRGD (theoretical MW 48583 Da); B: C16spRGE (theoretical MW 48597 Da); C: ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) (theoretical MW 49482 Da); D: ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGEfK) (theoretical MW 49496 Da). In C and D residual ntag<sup>Cys</sup>C16 (48564 Da) (non-modified with peptide) can be detected due to non-quantitative coupling reactions. The recorded masses of the full-length proteins are not accurate due to the size of the proteins. Therefore, the proteins were additionally digested with Glu-C yielding 17 fragments, which allows an improved resolution of the mass spectra (see Supplementary Table S1).



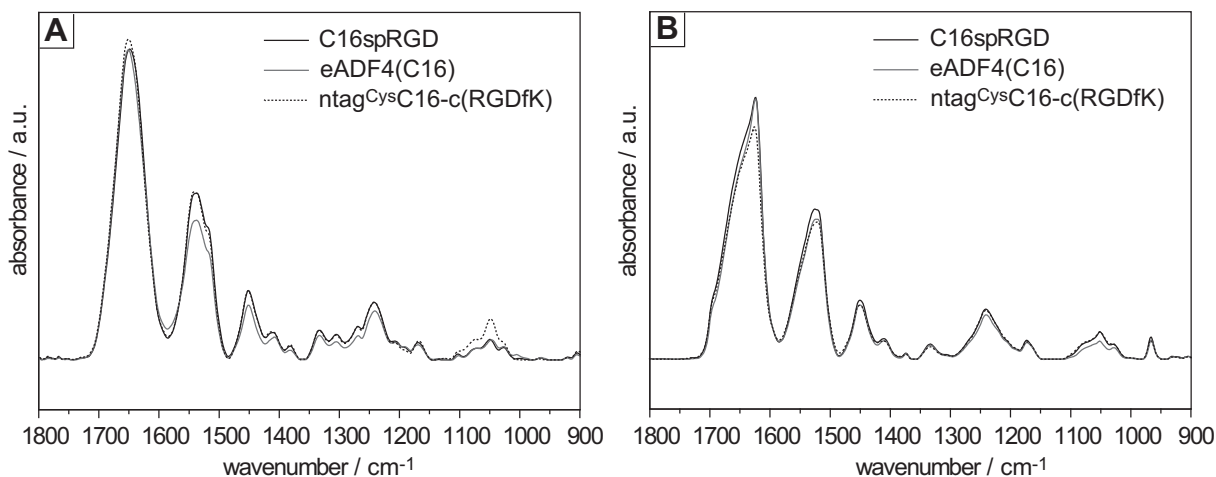
**Fig. 3.** CD spectra of eADF4(C16) (black line), C16spRGD (gray line) and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) (black dashed line) in 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, pH 7.5.

or presence of functional groups [51] among others. Here, the surface roughness and water contact angle of the different ethanol-treated silk films were analyzed in comparison to treated, fibronectin-coated and untreated cell culture plates (Table 2). AFM measurements of the different protein films as well as of the controls revealed a relatively smooth surface with an average roughness ( $R_a$ ) of less than 10 nm (Table 2). The roughness of films of the modified proteins showed slightly increased  $R_a$  values compared to films of unmodified eADF4(C16). However, the

changes were not significant. Typical  $R_a$  values of surfaces applied for cell studies are reported to be between 0.2  $\mu\text{m}$  and 4.9  $\mu\text{m}$  [52]. In this range, the adhesion of cells is largely affected by the roughness of the surface depending on the cell type. In the case of fibroblasts, Wang *et al.* described a difference in the strength of adhesion on titanium alloy surfaces with an average roughness between 2.75 and 30.34 nm. However, this effect could be mainly attributed to the observed change of the contact angle [53]. The nanometer differences between recombinant silk surfaces in absence or presence of modifications were negligible in our study, since all tested silk protein films revealed similar contact angles of about 60°. The water contact angle was not affected by any of the modifications of eADF4(C16), although for other surfaces, e.g. made of polyurethane, an increase in hydrophilicity was recorded after modification with RGD [54]. For fibroblasts, maximal cell adherence occurs at contact angles between 55° and 85° [3], indicating that the water contact angles of the silk films were in the optimal range for cultivation of fibroblasts. Contact angles of the treated and fibronectin-coated cell culture plates were slightly higher (82.3° and 76.2° respectively), but still ideal for fibroblast adhesion, whereas the non-treated cell culture plates were too hydrophobic (95.7°).

### 3.4. Fibroblast adhesion

Adhesion of BALB/3T3 mouse fibroblasts on eADF4(C16), C16spRGD and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) films, as well as on C16spRGE and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGEfK) films was analyzed after 1.5 h of incubation (Fig. 5). Non-treated cell culture plates were used as control for weak adhesion, and treated cell culture plates were used as control



**Fig. 4.** FTIR spectra of eADF4(C16), C16spRGD and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) films cast from ammonium bicarbonate buffered solutions before (A) and after (B) post-treatment with ethanol.

**Table 1**  
Secondary structure analysis of eADF4(C16), C16spRGD and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) films cast from aqueous solutions before and after post-treatment with ethanol using FTIR spectroscopy. Fourier self-deconvolution (FSD) of the amide I band (1590–1720  $\text{cm}^{-1}$ ) was performed, and the bands were assigned to individual secondary structure elements as described previously [41].

	As cast			EtOH treated		
	eADF4(C16)	C16spRGD	ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGDfK)	eADF4(C16)	C16spRGD	ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGDfK)
Alpha-helices / % (1656–1662 $\text{cm}^{-1}$ )	13.0 ± 1.9	13.6 ± 0.5	13.2 ± 0.2	7.9 ± 0.1	8.0 ± 0.2	8.2 ± 0.1
Beta-sheets / % (1616–1637 $\text{cm}^{-1}$ , 1697–1703 $\text{cm}^{-1}$ )	20.7 ± 1.5	21.3 ± 0.01	21.1 ± 1.5	40.9 ± 0.3	38.5 ± 0.9	38.9 ± 0.2
Random coils / % (1638–1655 $\text{cm}^{-1}$ )	36.1 ± 1.4	36.4 ± 1.1	36.0 ± 1.2	25.5 ± 0.7	26.8 ± 0.9	27.2 ± 0.2
Beta-turns / % (1663–1696 $\text{cm}^{-1}$ )	25.9 ± 1.7	24.4 ± 1.8	25.5 ± 0.3	19.6 ± 0.2	20.6 ± 0.4	20.6 ± 0.1
Others / % (1605–1615 $\text{cm}^{-1}$ )	4.3 ± 0.03	4.3 ± 0.3	4.3 ± 0.7	6.1 ± 0.5	6.2 ± 0.4	5.2 ± 0.2

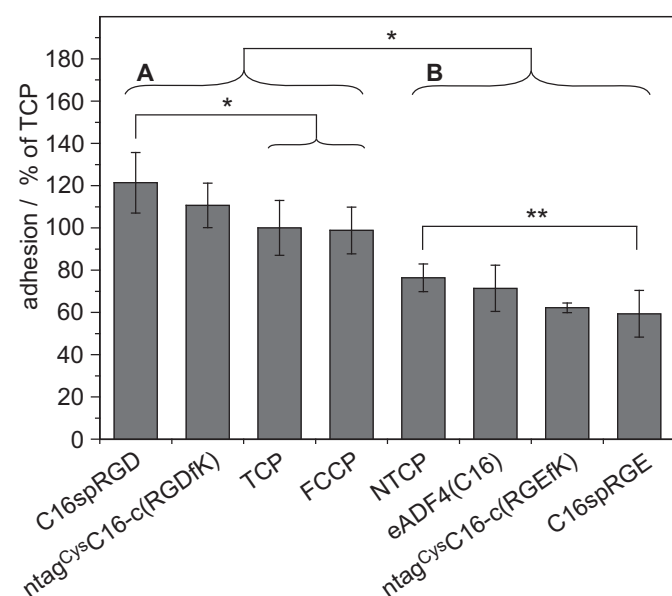
**Table 2**

Water contact angles and average roughness ( $R_a$ ) of eADF4(C16), C16spRGD and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) films cast from aqueous solutions after treatment with ethanol, as well as of treated cell culture plates (TCP), fibronectin-coated cell culture plates (FCCP) and non-treated cell culture plates (NTCP). For the determination of the average roughness, AFM measurements were performed, and  $R_a$  was calculated in an area of  $25 \mu\text{m}^2$ .

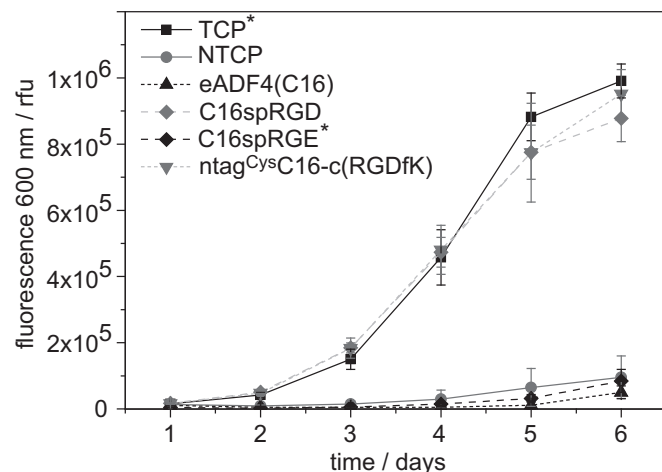
	Contact angle / °	Roughness ( $R_a$ /nm)
eADF4(C16)	$58.5 \pm 2.5$	$2.9 \pm 1.4$
C16spRGD	$60.1 \pm 2.3$	$4.8 \pm 4.4$
ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGDfK)	$61.8 \pm 1.8$	$5.8 \pm 1.2$
TCP	$82.3 \pm 2.0$	$3.7 \pm 0.6$
FCCP	$76.2 \pm 1.3$	$3.8 \pm 0.8$
NTCP	$95.7 \pm 5.8$	$4.3 \pm 0.4$

for good adhesion. The surface of the treated plates is specially modified to make the normally hydrophobic polystyrene more hydrophilic, but it does not contain any adhesion proteins. Therefore, fibronectin-coated cell culture plates were used as an additional control, since the surface is likely more comparable to RGD-modified silk films. Adhesion of fibroblasts on fibronectin-coated surfaces was equal to that on treated cell culture plates, whereas cell adhesion on the non-treated control plates was reduced to about 75% compared to that on treated cell culture plates.

Fibroblast adhesion on eADF4(C16) films was similar to that on non-treated cell culture plates, as previously published [5]. Since in the absence of adhesion motifs the physicochemical properties of a surface play an important role, the low adherence of cells on eADF4(C16) films is partly caused by the surface smoothness which



**Fig. 5.** Adhesion of BALB/3T3 mouse fibroblasts to treated cell culture plates (TCP), fibronectin-coated cell culture plates (FCCP), non-treated cell culture plates (NTCP), eADF4(16)/C16spRGD/C16spRGE/ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGEfK) films with a cell seeding density of 75,000 cells/cm<sup>2</sup>. Cell attachment was quantified by the cell-titer blue assay, measuring the fluorescence intensity of resorufin ( $\lambda_{\text{ex}}$  530 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  590 nm) in a microplate reader. Adhesion to treated cell culture plates was set to 100%, and all values were normalized accordingly. There was a significant difference in cell adhesion between group A (C16spRGD/ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK)/fibronectin-coated cell culture plates/treated cell culture plates) and group B (eADF4(C16)/non-treated cell culture plate/C16spRGE/ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGEfK)) ( $p < 0.005$ ). Within group A, a significantly higher cell adhesion could be observed in case of C16spRGD films compared to fibronectin-coated or treated cell culture plates ( $p < 0.005$ ), within group B a significantly lower cell adhesion could be observed for C16spRGE compared to the non-treated control ( $**p = 0.041$ ). Calculations of mean and standard deviation are based on one representative experiment ( $n = 8$ ).



**Fig. 6.** Proliferation of BALB/3T3 mouse fibroblasts cultured on treated cell culture plates (TCP), non-treated cell culture plates (NTCP), eADF4(16)/C16spRGD/C16spRGE and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) films with a cell seeding density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> for 6 days. Cell numbers were evaluated using the cell-titer blue assay, measuring the fluorescence intensity of resorufin ( $\lambda_{\text{ex}}$  530 nm;  $\lambda_{\text{em}}$  590 nm) in a microplate reader. Calculations of mean and standard deviation are based on one representative experiment ( $n = 8$ ). \*Cell proliferation on fibronectin-coated cell culture plates was indistinguishable from treated cell culture plates, and cell proliferation on ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGEfK) films was indistinguishable from that on C16spRGE films (for clarity of the figure these values are not shown).

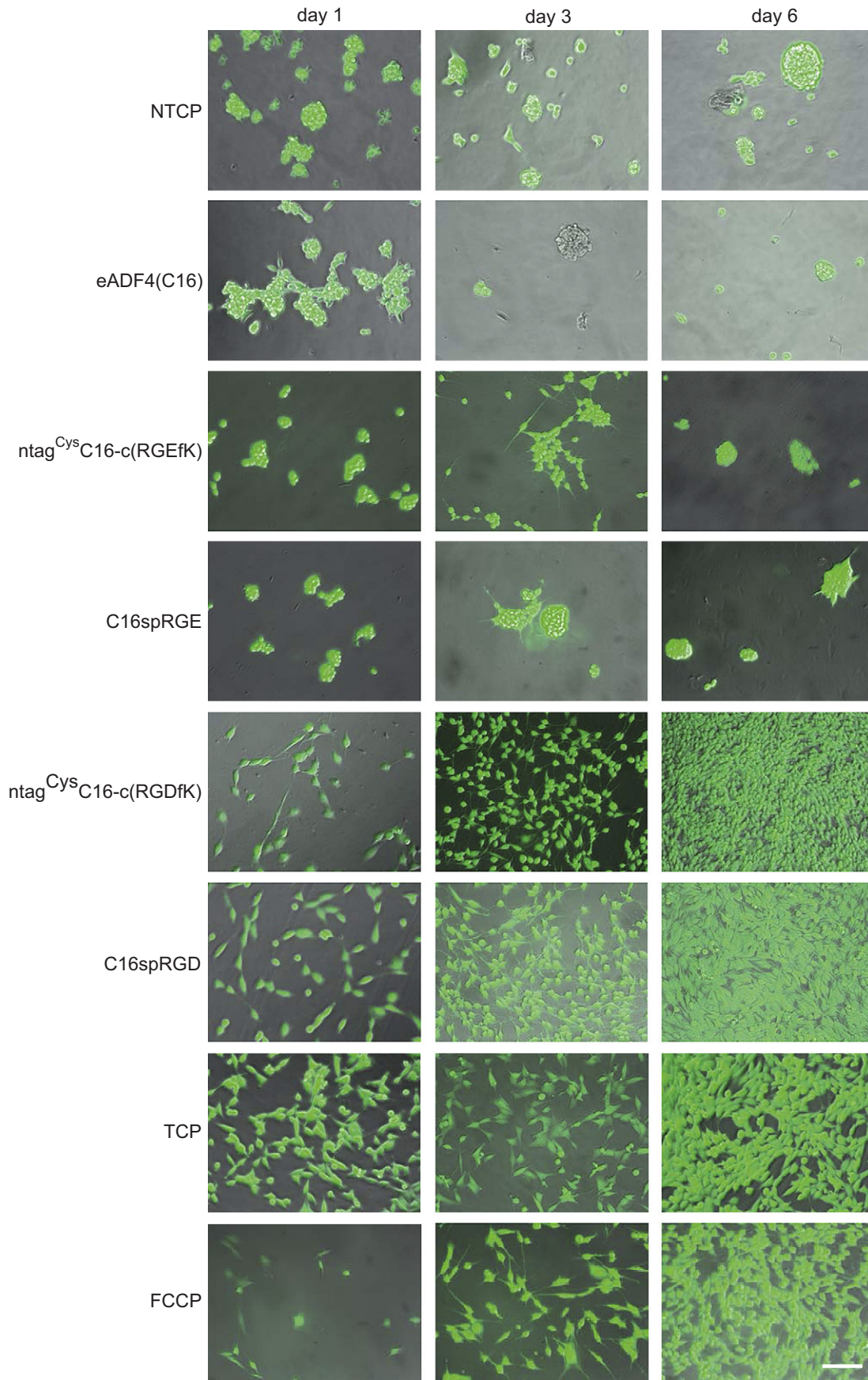
prevents physical anchorage of cells. Films of RGD-modified silk proteins showed a significantly increased fibroblast adhesion compared to films made of eADF4(C16). Cell adhesion on C16spRGD films was even higher ( $p < 0.05$ ) than on treated or fibronectin-coated control plates (Fig. 5). Interestingly, the cell-binding activity of the linear RGD (in the genetically made hybrid) was indistinguishable from that of the cyclic RGD (chemically coupled), even though RGD cyclopeptides have been reported to be more active [15,22,55,56]. The adhesion of MC3T3-E1 mouse osteoblasts to hydrogels prepared from recombinant elastin-mimetic polypeptides was found to be almost 100% higher, when the cyclic RGDfK peptide was used for chemical modification than when employing a linear FRGDS peptide [57]. This aberrant behavior compared to that of BALB fibroblasts can be explained by the selectivity of different cells toward different RGD peptides. Cells express a set of different integrin subtypes, and depending on the sequence and structure of the RGD motif the affinity toward certain subtypes varies [25,58,59]. The linear GRGDSP peptide (which is part of C16spRGD) and the cyclic c(RGDfK) peptide (used for chemical modification) have similar activity for  $\alpha_5\beta_1$  integrin, but the cyclic compound is 6–7 times more selective for  $\alpha_v\beta_3$  integrins

**Table 3**

Proliferation rate ( $\mu$ ) and doubling times of BALB/3T3 mouse fibroblasts cultured on treated cell culture plates (TCP), fibronectin-coated cell culture plates (FCCP), non-treated cell culture plates (NTCP), eADF4(16)/C16spRGD/C16spRGE/ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGEfK) films for 6 days. (n.d.: not detectable).

	$\mu_{\text{max}} / \text{d}^{-1}$	Doubling time / h
TCP	$1.07 \pm 0.02$	$15.54 \pm 0.30$
FCCP	$1.05 \pm 0.03$	$15.90 \pm 0.48$
C16spRGD	$0.98 \pm 0.02$	$16.91 \pm 0.33$
ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGDfK)	$1.00 \pm 0.03$	$16.57 \pm 0.49$
eADF4(C16)	n.d.	n.d.
C16spRGE	n.d.	n.d.
ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGEfK)	n.d.	n.d.
NTCP	n.d.	n.d.





**Fig. 7.** Calcein A/M staining of BALB/3T3 mouse fibroblasts growing on non-treated cell culture plates (NTCP), eADF4(16)/ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGEfK)/C16spRGE/ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) and C16spRGD films, treated cell culture plates (TCP), and fibronectin-coated cell culture plates (FCCP) with a cell seeding density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> for 1, 3 and 6 days. Pictures were taken using a fluorescence microscope (20× magnification). Transmitted light images were taken simultaneously and merged with the fluorescence images. (scale bar: 100 μm, all images have an identical magnification).

than the linear structure [15,58]. Another reason for the observed similarity of the cyclic and linear RGD peptide on BALB/3T3 fibroblasts adhesion and proliferation in context of our silk films could be that chemical coupling is not quantitative and yields only 70–90 % of functionalization [33], potentially lowering the amount of surface-accessible RGD domains in comparison to films of the hybrid silk (with every silk molecule containing the RGD motif). This fact could be important since the surface density of RGD has an influence on cell adhesion, proliferation and spreading [60–62]. The presentation of RGD motifs on the film surfaces has not yet been determined. However, in a previous study we analyzed the accessibility of thiol groups on the surface of ntag<sup>Cys</sup>C16 films by coupling of nanogold particles [33]. The nanoparticles were homogeneously distributed with an average density of 185 fmol/cm<sup>2</sup>, which is in a range that would be sufficient in supporting cell attachment, if RGD peptides were coupled. Besides, even though the linear RGD peptide has probably no conformation like the cyclic RGD peptide, it could be flexible enough to adopt an active conformation after binding transmembrane integrin receptors. Finally, the site of modification could have an impact on the function, since C16spRGD is modified at the C-terminus, whereas the RGD motif in ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) is chemically coupled to the N-terminus, also having a larger spacing between the RGD domain and the silk protein. Structural differences of the two termini might have an influence on the folding and the surface availability of the RGD domain after film formation.

To show the sequence specificity of the RGD modifications, the aspartic acid residue was replaced by a glutamic acid residue in both the chemically coupled peptide and the hybrid, since the RGE-sequence has previously been shown to have no influence on cell adhesion [63]. Cells on films of RGE-modified silk proteins showed a similar adhesion behavior as on unmodified eADF4(C16) films, being significantly lower than that on non-treated control plates (Fig. 5). Due to the lack of cell adhesion domains, attachment of cells is largely affected by the surface charge, the hydrophobicity as well as the microstructure and mechanical properties of the surface, leading to differences in the adhesion of fibroblasts to these surfaces.

### 3.5. Fibroblast proliferation

Proliferation of fibroblasts on silk films and the control plates was analyzed over 6 days (Fig. 6). Fibroblasts cultured on films of RGD-modified silk proteins showed the same exponential growth profile as those cultured on treated or fibronectin-coated cell culture plates. Again, the influence on cell adhesion of the linear RGD sequence in the hybrid silk protein was indistinguishable from that of the covalently attached cyclic RGD peptide. The calculated proliferation rate constants ( $\mu$ ) and doubling times ( $T_d$ ) of fibroblasts on the different surfaces showed no significant difference independent of the surface (Table 3), indicating that the better attachment of fibroblasts to C16spRGD did not significantly improve the proliferation of the cells. Even though it was shown in a previous study that attachment of 3T3 Swiss albino cells to the cyclic RGDfK was about 2-fold faster than to the linear RGDS, due to a higher affinity for the integrin receptors [55], this effect did not lead to a significant difference in cell spreading or proliferation. Also, in the case of LTK<sup>-</sup> cells (mouse fibroblasts, thymidine kinase-negative L cells) a similar spreading behavior was observed when comparing the cyclic RGDfK to linear GRGDS and GRGDSP sequences [64]. These findings are probably due to the fact that cells up-regulate the production of ECM proteins in relation to cell adhesion (collagen type-I and fibronectin), therefore only at early stages of adhesion strong effects/differences can be seen. In the control experiments, fibroblasts seeded on eADF4(C16) films as

well as on RGE-variant films or non-treated plates did not proliferate (Fig. 6).

### 3.6. Analysis of cell morphology

After staining of living cells with Calcein A/M, their morphology was analyzed using a fluorescence microscope (Fig. 7). The spherical morphology and clustering of the cells on the non-treated control plate as well as on eADF4(C16) films and the films of the RGE-variants confirmed our previous data. Cell–cell interactions seem to be superior to cell–surface interactions, inducing cell aggregation and eventually apoptosis. Neither the morphology nor the cell number changed significantly over 6 days, since cell adhesion was probably too weak and cells were removed during washing. These results are similar to those obtained for *Bombyx mori* silk films [65]. In contrast, fibroblasts cultured on treated or fibronectin-coated cell culture plates or on films of the RGD-silk proteins showed a flat and spread morphology with confluence after 6 days of incubation (Fig. 7).

Staining of dead cells with Ethidium Homodimer I was not performed because the dye strongly adsorbs to silk surfaces, which not only diminishes its availability in the medium but also increases the background signals, which in turn decreases the sensitivity for detection of dead cells.

## 4. Summary

Two strategies were employed for modification of silk proteins with RGD motifs, each having advantages and disadvantages. Chemical functionalization allows coupling of a large variety of molecules, including cyclic peptides, while genetic modification is limited to natural amino acids, except for the introduction of some non-natural amino acids. To date, more than 50 non-natural amino acids have been successfully incorporated into proteins for various applications [66]. However, this approach is limited due to the lack of selectivity and the low incorporation efficiency of such amino acids [66]. Besides, D-amino acids or  $\beta$ -amino acids cannot be integrated due to their incompatibility with the ribosome [66]. However, the advantage of genetic engineering is the direct usability of the hybrid proteins after purification, while the chemical approach requires several steps after protein purification to achieve the desired product. It is also worth mentioning that distinct coupling chemicals might have critical side-effects in the human body. The most important drawback of chemical modifications might be the not quantitative coupling, with efficiencies between 70 and 90%.

## 5. Conclusions

The genetically modified silk proteins presenting linear RGD-motifs are as potent as the silk proteins chemically functionalized with cyclic RGD peptides in regard to fibroblast adhesion and proliferation. Thus, these RGD-containing hybrid silk proteins reflect a promising material for future tissue engineering applications.

## Acknowledgments

This work was financially supported by the U.S. Army Research Office (grant W911NF-0810284). We would like to thank Andrew Smith for critical comments on the manuscript, Martin Humenik, Martina Elsner, Verena Streit and Jasmin Wickinghoff for technical support and Kristina Spieß and Claudia Blüm for fruitful discussions.



## Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.069>.

## References

- [1] Eisenbarth E. Biomaterials for tissue engineering. *Adv Eng Mater* 2007;9: 1051–60.
- [2] Vladkova TG. Surface engineered polymeric biomaterials with improved bio-contact properties. *Int J Polym Sci* 2010. Article ID 296094.
- [3] Tamada Y, Ikada Y. Fibroblast growth on polymer surfaces and biosynthesis of collagen. *J Biomed Mater Res* 1994;28:783–9.
- [4] Wei J, Igarashi T, Okumori N, Maetani T, Liu B, Yoshinari M. Influence of surface wettability on competitive protein adsorption and initial attachment of osteoblasts. *Biomed Mater* 2009;4:045002.
- [5] Leal-Egana A, Lang G, Mauerer C, Wickinghoff J, Weber M, Geimer S, et al. Interactions of fibroblasts with different morphologies made of an engineered spider silk protein. *Adv Eng Mater* 2011;14:B67–75.
- [6] Lensen MC, Schulte VA, Salber J, Diez M, Menges F, Moller M. Cellular responses to novel, micropatterned biomaterials. *Pure Appl Chem* 2008;80: 2479–87.
- [7] van Kooten TG, Spijker HT, Busscher HJ. Plasma-treated polystyrene surfaces: model surfaces for studying cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 2004; 25:1735–47.
- [8] Elvira C, Yi F, Azevedo MC, Rebouta L, Cunha AM, San Roman J, et al. Plasma-and chemical-induced graft polymerization on the surface of starch-based biomaterials aimed at improving cell adhesion and proliferation. *J Mater Sci Mater Med* 2003;14:187–94.
- [9] Yoshihiro I. Tissue engineering by immobilized growth factors. *Mater Sci Eng C* 1998;6:267–74.
- [10] Hwang DS, Sim SB, Cha HJ. Cell adhesion biomaterial based on mussel adhesive protein fused with RGD peptide. *Biomaterials* 2007;28: 4039–46.
- [11] Schaffner P, Meyer J, Dard M, Wenz R, Nies B, Verrier S, et al. Induced tissue integration of bone implants by coating with bone selective RGD-peptides in vitro and in vivo studies. *J Mater Sci Mater Med* 1999;10:837–9.
- [12] Kammerer PW, Heller M, Brieger J, Klein MO, Al-Nawas B, Gabriel M. Immobilisation of linear and cyclic RGD-peptides on titanium surfaces and their impact on endothelial cell adhesion and proliferation. *Eur Cells Mater* 2011; 21:364–72.
- [13] Shu XZ, Ghosh K, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Clark RA, et al. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 2004;68:365–75.
- [14] Li B, Chen JX, Wang JHC. RGD peptide-conjugated poly(dimethylsiloxane) promotes adhesion, proliferation, and collagen secretion of human fibroblasts. *J Biomed Mater Res A* 2006;79:989–98.
- [15] Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 2003;24:4385–415.
- [16] Kanteleiner M, Finsinger D, Meyer J, Schaffner P, Jonczyk A, Diefenbach B, et al. Selective RGD-mediated adhesion of osteoblasts at surfaces of implants. *Angew Chem Int Edit* 1999;38:560–2.
- [17] Morgan AW, Roskov KE, Lin-Gibson S, Kaplan DL, Becker ML, Simon Jr CG. Characterization and optimization of RGD-containing silk blends to support osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2008;29:2556–63.
- [18] Bini E, Foo CW, Huang J, Karageorgiou V, Kitchel B, Kaplan DL. RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules* 2006;7:3139–45.
- [19] Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 2001;54:139–48.
- [20] Asakura T, Tanaka C, Yang M, Yao J, Kurokawa M. Production and characterization of a silk-like hybrid protein, based on the polyaniline region of *Samia cynthia ricini* silk fibroin and a cell adhesive region derived from fibronectin. *Biomaterials* 2004;25:617–24.
- [21] Delforge D, Gillon B, Art M, Dewelle J, Raes M, Remacle J. Design of a synthetic adhesion protein by grafting RGD tailed cyclic peptides on bovine serum albumin. *Lett Pept Sci* 1998;5:87–91.
- [22] Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *J Biol Chem* 1987; 262:17294–8.
- [23] Haubner R, Finsinger D, Kessler H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the  $\alpha(V)\beta(3)$  integrin for a new cancer therapy. *Angew Chem Int Edit* 1997;36:1375–89.
- [24] Aumailley M, Gurrath M, Muller G, Calvete J, Timpl R, Kessler H. Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett* 1991;291:50–4.
- [25] Meyer A, Auerneimer J, Modlinger A, Kessler H. Targeting RGD recognizing integrins: drug development, biomaterial research, tumor imaging and targeting. *Curr Pharm Design* 2006;12:2723–47.
- [26] Humenik M, Smith AM, Scheibel T. Recombinant spider silks—biopolymers with potential for future applications. *Polymers* 2011;3:640–61.
- [27] Forrest RD. Early history of wound treatment. *J Roy Soc Med* 1982;75: 198–205.
- [28] Huemmerich D, Helsen CW, Quedzuweit S, Oschmann J, Rudolph R, Scheibel T. Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* 2004;43:13604–12.
- [29] Rising A, Widhe M, Johansson J, Hedhammar M. Spider silk proteins: recent advances in recombinant production, structure–function relationships and biomedical applications. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:169–84.
- [30] Vendrely C, Scheibel T. Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol Biosci* 2007;7:401–9.
- [31] Xia XX, Qian ZG, Ki CS, Park YH, Kaplan DL, Lee SY. Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14059–63.
- [32] Slotta U, Tammer M, Kremer F, Koelsch P, Scheibel T. Structural analysis of spider silk films. *Supramol Chem* 2006;18:465–71.
- [33] Spiess K, Wohlrab S, Scheibel T. Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* 2010;6:4168–74.
- [34] Lammel A, Schwab M, Slotta U, Winter G, Scheibel T. Processing conditions for the formation of spider silk microspheres. *ChemSusChem* 2008;1:413–6.
- [35] Slotta UK, Rammensee S, Gorb S, Scheibel T. An engineered spider silk protein forms microspheres. *Angew Chem Int Edit* 2008;47:4592–4.
- [36] Hermanson KD, Huemmerich D, Scheibel T, Bausch AR. Engineered microcapsules fabricated from reconstituted spider silk. *Adv Mater* 2007;19: 1810–5.
- [37] Schacht K, Scheibel T. Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules* 2011;12:2488–95.
- [38] Spiess K, Lammel A, Scheibel T. Recombinant spider silk proteins for applications in biomaterials. *Macromol Biosci* 2010;10:998–1007.
- [39] Acharya C, Ghosh SK, Kundu SC. Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:2827–36.
- [40] Seo YK, Yoon HH, Park YS, Song KY, Lee WS, Park JK. Correlation between scaffold in vivo biocompatibility and in vitro cell compatibility using mesenchymal and mononuclear cell cultures. *Cell Biol Toxicol* 2009;25:513–22.
- [41] Hu X, Kaplan D, Cebe P. Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* 2006;39:6161–70.
- [42] Goncalves R, da Silva CL, Ferreira BS, Lemos MA, Lemos F, Almeida-Porada G, et al. Kinetic analysis of the ex vivo expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Biotechnol Lett* 2006;28:335–40.
- [43] Meinel T, Mechulam Y, Blanquet S. Methionine as translation start signal – a review of the enzymes of the pathway in *Escherichia coli*. *Biochimie* 1993; 75:1061–75.
- [44] Spiess K, Ene R, Keenan CD, Senker J, Kremer F, Scheibel T. Impact of initial solvent on thermal stability and mechanical properties of recombinant spider silk films. *J Mater Chem* 2011;21:13594–604.
- [45] Cao H, Chen X, Huang L, Shao ZZ. Electrospinning of reconstituted silk fiber from aqueous silk fibroin solution. *Mat Sci Eng C-Mater* 2009;29:2270–4.
- [46] Jin HJ, Chen JS, Karageorgiou V, Altman GH, Kaplan DL. Human bone marrow stromal cell responses on electrospun silk fibroin mats. *Biomaterials* 2004;25: 1039–47.
- [47] Wenk E, Wandrey AJ, Merkle HP, Meinel L. Silk fibroin spheres as a platform for controlled drug delivery. *J Control Release* 2008;132:26–34.
- [48] Kluge JA, Rabotyagova O, Leisk GG, Kaplan DL. Spider silks and their applications. *Trends Biotechnol* 2008;26:244–51.
- [49] O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 2005;26:433–41.
- [50] Chung TW, Liu DZ, Wang SY, Wang SS. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials* 2003; 24:4655–61.
- [51] Lydon MJ, Minett TW, Tighe BJ. Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. *Biomaterials* 1985;6:396–402.
- [52] Kunzler TP, Drobek T, Schuler M, Spencer ND. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* 2007;28:2175–82.
- [53] Wang RCC, Hsieh MC, Lee TM. Effects of nanometric roughness on surface properties and fibroblast's initial cytocompatibilities of Ti6Al4V. *Bio-interphases* 2011;6:87–97.
- [54] Lin HB, Sun W, Mosher DF, Garciaecheverria C, Schaufelberger K, Lelkes PI, et al. Synthesis, surface, and cell-adhesion properties of polyurethanes containing covalently grafted RGD-peptides. *J Biomed Mater Res* 1994;28:329–42.
- [55] Kato M, Mrksich M. Using model substrates to study the dependence of focal adhesion formation on the affinity of integrin-ligand complexes. *Biochemistry* 2004;43:2699–707.
- [56] Xiao Y, Truskey GA. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. *Biophys J* 1996;71:2869–84.
- [57] Kaufmann D, Fiedler A, Junger A, Auerneimer J, Kessler H, Weberskirch R. Chemical conjugation of linear and cyclic RGD moieties to a recombinant elastin-mimetic polypeptide – a versatile approach towards bioactive protein hydrogels. *Macromol Biosci* 2008;8:577–88.
- [58] Kanteleiner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, et al. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem* 2000;1:107–14.
- [59] Haubner R, Grätias R, Diefenbach B, Goodman SL, Jonczyk A, Kessler H. Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as

- highly potent and selective integrin  $\alpha(v)\beta(3)$  antagonists. *J Am Chem Soc* 1996;118:7461–72.
- [60] Massia SP, Hubbell JA. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin  $\alpha$ -V- $\beta$ -3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J Cell Biol* 1991;114:1089–100.
- [61] Cavalcanti-Adam EA, Micoulet A, Blummel J, Auernheimer J, Kessler H, Spatz JP. Lateral spacing of integrin ligands influences cell spreading and focal adhesion assembly. *Eur J Cell Biol* 2006;85:219–24.
- [62] Huang J, Gräter SV, Corbellini F, Rinck S, Bock E, Kemkemer R, et al. Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion. *Nano Lett* 2009;9: 1111–6.
- [63] Bellahcene A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF, et al. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res* 2000;86:885–91.
- [64] Kalinina S, Gliemann H, Lopez-Garcia M, Petershans A, Auernheimer J, Schimmel T, et al. Isothiocyanate-functionalized RGD peptides for tailoring cell-adhesive surface patterns. *Biomaterials* 2008;29:3004–13.
- [65] Gao Z, Wang S, Zhu HS, Su CN, Xu GL, Lian XJ. Using selected uniform cells in round shape with a micropipette to measure cell adhesion strength on silk fibroin-based materials. *Mat Sci Eng C-Bio S* 2008;28:1227–35.
- [66] Wang Q, Parrish AR, Wang L. Expanding the genetic code for biological studies. *Chem Biol* 2009;16:323–36.



## Supplementary Data

**Tab. S 1** MALDI-TOF MS analysis of genetically and chemically RGD- and RGE-modified recombinant spider silk proteins. Digestion with Glu-C yields three fragment species (C-terminus, C-module, N-terminus  $\Delta$  Met). Calculated and experimental  $m/z$  values are shown.

	C16spRGD		C16spRGE	
	Calculated $m/z$ values	Experimental $m/z$ values	Calculated $m/z$ values	Experimental $m/z$ values
<b>C-terminus</b>	2241	2240	2255	2255
<b>C-module</b>	2900	2900	2900	2900
<b>N-terminus <math>\Delta</math> Met</b>	3000	3000	3000	3000
	ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGDfK)		ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGEfK)	
	Calculated $m/z$ values	Experimental $m/z$ values	Calculated $m/z$ values	Experimental $m/z$ values
<b>C-module</b>	2900	2901	2900	2900
<b>N-terminus <math>\Delta</math> MetAla</b>	3832	3832	3832	3836
<b>N-terminus <math>\Delta</math> MetAla + c(RGDfK) or c(RGEfK)</b>	4765	4764	4779	4778

## TEILARBEIT II

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in *Biomaterials Science* veröffentlicht als:

"Controllable cell adhesion, growth and orientation on layered silk protein films."

Bauer, F.\*, Wohlrab, S.\*, und Scheibel, T.

Reproduziert aus *Biomaterials Science* **2013**, 1(12): 1244-1249 mit freundlicher

Genehmigung des Verlages The Royal Society of Chemistry.

\* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

## PAPER

# Controllable cell adhesion, growth and orientation on layered silk protein films†

Cite this: *Biomater. Sci.*, 2013, **1**, 1244

Felix Bauer,‡ Stefanie Wohlrab‡ and Thomas Scheibel\*

Received 2nd May 2013,  
Accepted 9th July 2013  
DOI: 10.1039/c3bm60114e

www.rsc.org/biomaterialsscience

Due to their mechanical stability, biocompatibility and biodegradability, silks are promising materials for various biomedical applications including tissue engineering. Since the shape and the organisation of cells in and on scaffolds both affect their function, we tested patterned silk scaffolds made of three different silk proteins concerning their influence on cell adhesion, growth and orientation. Two different cell lines, BALB/3T3 fibroblasts and C2C12 myoblasts, showed controllable cell adhesion as well as orientation dependent on the silk proteins used and patterns made. Surprisingly, the presence of the integrin binding motif RGD did not influence cell adhesion and orientation on structured silk films, although it did so significantly on flat films.

## Introduction

Silks are protein-based fibres produced by various arthropods including spiders and insects. They are well known for their mechanical stability, biocompatibility and biodegradability, which allow their use in biomedical applications.<sup>1</sup> In contrast to obtaining silk proteins from natural sources, recombinantly produced silk proteins have the advantages of a defined composition, constantly high purity, and quality.<sup>2</sup> Further, recombinant silk proteins can be processed into different morphologies such as fibres, nonwoven-meshes, capsules, particles, hydrogels, foams, and films.<sup>3,4</sup>

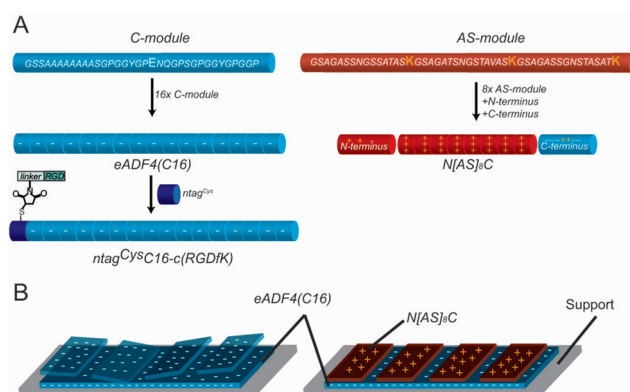
Previously it has been shown that BALB/3T3 fibroblast adhesion is weak on flat eADF4(C16) (a recombinantly produced engineered spider silk protein) films,<sup>5</sup> based on the lack of specific motifs for cell attachment in the protein's primary structure. Introduction of such motifs can improve cell adhesion on flat silk films.<sup>6–9</sup> eADF4(C16) modified with the integrin binding motif RGD yielded significantly improved cell adhesion and proliferation.<sup>8</sup>

In tissue engineering it is further essential to restore the tissue structure and organisation. In most organs the cells and the extracellular matrix (ECM) are aligned, being essential for their cellular function and mechanical properties.<sup>10–12</sup>

The surface topography of a substrate is known to influence the adhesion and polarisation of cells. In order to align

different cell types, various scaffolds are currently in use, such as contact guidance materials like micro-/nanogrooved scaffolds or fiber mesh matrices made of polymeric fibers.<sup>13–17</sup> Most promising for tissue engineering applications are adhesive micro patterns produced by micro contact printing or other photolithographic methods. Parallel grooves for example promote topographical anchorage and orientation of the cells, which is important *e.g.* for bone implants, skin transplants, or artificial nerve tubes.<sup>13,14,16</sup> Patterned structures allow to align different cell types such as osteoblasts, cardiac cells, muscle cells, corneal epithelial cells, and fibroblasts.<sup>10,18–20</sup>

Here, we used structured films made of two different silk proteins (Fig. 1) to test the influence of chosen proteins and morphology on BALB/3T3 fibroblasts. As a second model, mouse myoblast cells from muscle were tested, which fuse to myotubes at high cell densities and need alignment to generate strength and tension.<sup>20,21</sup>



**Fig. 1** Schematic diagram of eADF4(C16), ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK), and N[AS]<sub>8</sub>C (A) and of films cast from proteins with identical and opposite charges (B).

Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30,  
95440 Bayreuth, Germany. E-mail: Thomas.scheibel@uni-bayreuth.de;

Fax: +49 921 557346; Tel: +49 921 557361

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3bm60114e

‡These authors contributed equally to this work.

## Materials and methods

### Protein production

The spider silk protein eADF4(C16) was produced and purified as described by Huemmerich *et al.*<sup>26</sup> Chemical coupling of synthesized cyclic RGD to ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) was performed as described previously.<sup>8</sup> The production of the recombinant lacewing egg stalk protein N[AS]<sub>8</sub>C was described by Bauer and Scheibel.<sup>27</sup>

### Coupling of NHS-fluorescein to N[AS]<sub>8</sub>C

1 mg of lyophilised N[AS]<sub>8</sub>C was dissolved in 6 M GdmSCN and dialysed against 20 mM HEPES (pH 7). For coupling, a 5-fold molar excess of NHS-fluorescein was added to the protein solution. After two hours of incubation at room temperature N[AS]<sub>8</sub>C was precipitated with ammonium sulphate, subsequently washed with distilled water, and lyophilised.

### Production of films

For production of unstructured films as well as for the ground layer films, lyophilized proteins were dissolved in formic acid and cast onto glass slides (1% (w/v), 0.15 mg cm<sup>-2</sup>) followed by evaporation of the solvent. Since spider silk films made from formic acid are water-insoluble, no post-treatment was necessary.<sup>24</sup>

To prove the water stability of films made of the recombinant lacewing egg stalk protein, 1% (w/v) N[AS]<sub>8</sub>C was dissolved in formic acid and cast into a 48 well plate. After drying, the films were incubated in water for 24 hours. Afterwards, wells with films and blank wells were stained with Coomassie Brilliant Blue, and the presence of films was inspected visually.

### Production of patterned two protein films

The patterns were made using photolithographically produced templates to generate PDMS (polydimethylsiloxane) negatives. First, silicon wafers were spin coated with a photoresist resulting in a 25 µm thick layer. After curing, the wafer was exposed with the desired mask and subsequently treated with gamma-(4-fluorophenyl)-gamma-butyrolactone to remove the photoresist from the undesired areas. As a result, grooves with a width

of 50 µm and ridges with a width of 20 µm with a height difference of 25 µm were retained (Fig. 2A).

Then, polydimethylsiloxane (PDMS) moulds were created by using a 10 : 1 mixture of PDMS prepolymer and curing agent. The mixture was degassed for 20 minutes and afterwards poured onto the wafer. The moulds were cured for 90 minutes at 80 °C, peeled from the wafer, and cut into pieces (Fig. 2B).

A protein ground layer was cast on a glass slide (see Production of films). To deposit a protein stripe (ridge), the PDMS moulds were placed with their structured side downwards on the ground layer films (Fig. 2C and D). A droplet of a 1% (w/v) solution of the second protein in formic acid was deposited at the open side of the channels (the ground layer remains stable as seen when using the same protein as the ground layer and the ridges of the latter peel off (ESI Fig. 1†)). Based on capillary forces the channels were filled with the protein solution (Fig. 2E). After drying, the mould was gently removed (Fig. 2F) and the films were investigated microscopically.

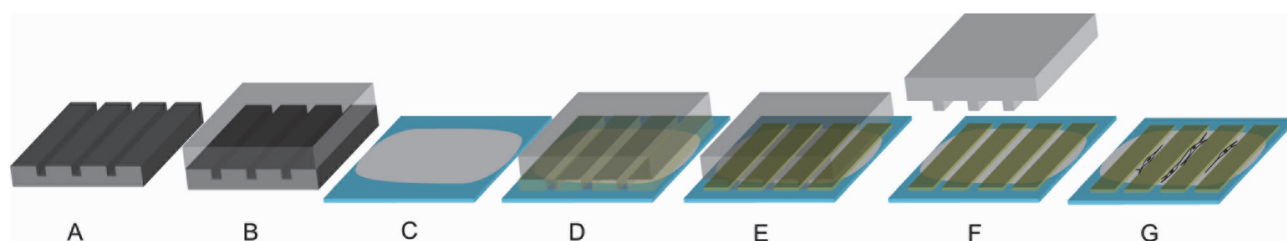
### Cell culture experiments

For cell culture experiments BALB/3T3 mouse fibroblasts and C2C12 mouse myoblasts (European Collection of Cell Cultures) were cultured in DMEM media (Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 10% foetal bovine serum (Biochrom, Berlin, Germany), 1% (v/v) GlutaMAX (Gibco, Grand Island, USA), and 0.1% (v/v) gentamicin sulphate (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). An incubator was used to control the atmosphere (5% CO<sub>2</sub>, 95% humidity) to maintain the cells.

The glass slides containing the protein films were placed in six well plates, and 5000 cells per cm<sup>2</sup> were seeded per film. The medium was changed once a day. Cells were cultured for up to 96 hours.

### Calcein-AM staining

BALB/3T3 fibroblasts were stained with 2 mM calcein acetoxymethyl ester (calcein A/M) (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Live cells were analyzed with a LeicaDMI3000 B fluorescence microscope after 15 min of incubation at 37 °C (Leica, Wetzlar, Germany).



**Fig. 2** Production of patterned films (the ridges have a width of 50 µm and a height of less than 1 µm, whereas the grooves (*i.e.* spacing between the ridges) have a width of 20 µm): A: a silicon wafer was used as a template to process a PDMS stamp (B); C: a film was cast on a glass slide to form a ground layer; D: a PDMS stamp was placed on the ground layer protein film; E: a protein solution with a second protein was soaked into the channels of the PDMS stamp by capillary forces; F: after drying, the PDMS stamp was removed, leaving ridges of the second protein; G: cells preferentially adhere and align on the ground layer but not on the ridges.

## Microscopy

To confirm the existence of the protein ridges and to measure the height of the ridges, fluorescein was coupled to N[AS]<sub>8</sub>C prior to inflating the mould. Subsequently, the films were observed in a confocal laser scanning microscope (DMI 6000 CS Leica).

Cell growth and alignment were observed with a Leica DMI 3000B microscope equipped with a camera. Images were made with and without cells at 48 h and at 96 h after fibroblast seeding.

## Picture analysis

To analyse the preferences of the cells to bind to different regions of the protein films, all adhered cells were marked in Powerpoint software by a line across the longest axis of the spread cells symbolising their orientation (e.g. 267 fibroblasts were present on the surface, 218 were spread and marked with a line, ESI Fig. 3†). Afterwards, spread cells were counted on each protein type and the percentage of cells on the bottom layer was calculated.

The orientation of the marked cells was measured using ImageJ software. The angle of the cells was measured relative to the groove direction of the film and plotted in 5° steps. The distribution and orientation of the cells were calculated from a minimum of three pictures.

## Results and discussion

### Employed proteins

To produce stable silk films with distinct topographies, proteins were chosen with different net charges (Fig. 1). N[AS]<sub>8</sub>C, an engineered protein based on the lacewing egg stalk protein MalXB2, was used as a polycationic silk protein and the spider silk protein eADF4(C16) with or without an RGD-modification as a polyanionic silk protein.<sup>5,8</sup>

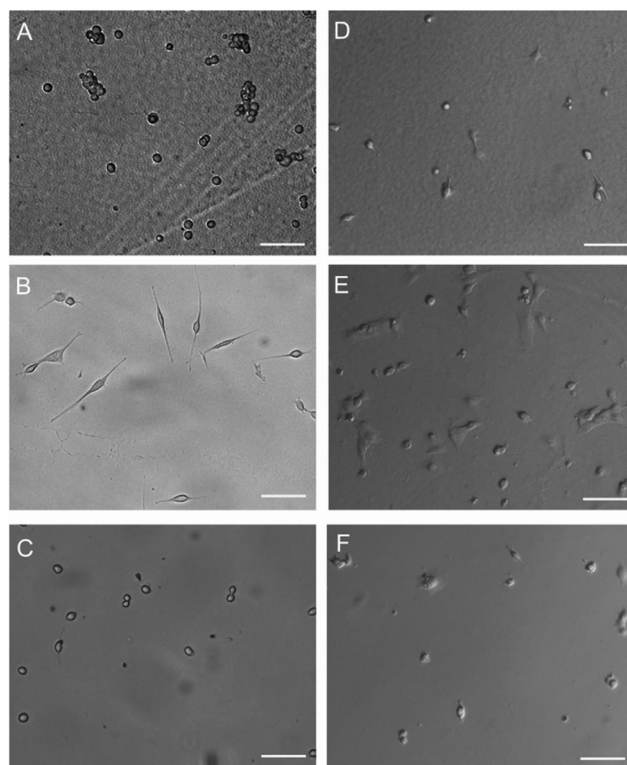
### Production of flat silk surfaces

The preparation of silk films with a flat surface is straightforward and has been shown previously.<sup>22</sup> Here, formic acid was chosen as a solvent for the proteins.<sup>23–25</sup> Previously, it was shown that eADF4(C16) films made from formic acid solutions are water-insoluble due to a high  $\beta$ -sheet content enabling direct use in cell culture without further post treatment.<sup>24</sup> The water stability of N[AS]<sub>8</sub>C films made from formic acid solution was confirmed by Coomassie staining of the films after intensive washing with water (data not shown).

### Fibroblast and myoblast adhesion on flat silk surfaces

BALB/3T3 mouse fibroblasts were seeded on eADF4(C16), ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK), a variant of eADF4(C16) with a chemically coupled, cyclic RGD-peptide,<sup>8</sup> and N[AS]<sub>8</sub>C films respectively.

As shown previously, BALB/3T3 fibroblasts adhered weakly on flat eADF4(C16) films, resulting in clustering of the cells



**Fig. 3** A–C: BALB/3T3 mouse fibroblasts cultured on films made of eADF4(C16) (A), ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) (B) or N[AS]<sub>8</sub>C (C) with a cell seeding density of 5000 cells per cm<sup>2</sup> after 24 hours of incubation. D–F: C2C12 myoblasts cultured on films made of eADF4(C16) (D), ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) (E) or N[AS]<sub>8</sub>C (F) with a cell seeding density of 5000 cells per cm<sup>2</sup> after 24 hours of incubation. Scale bars: 100  $\mu$ m.

(Fig. 3A),<sup>5,8</sup> based on the low surface roughness and the lack of adhesion motifs in the primary structure of eADF4(C16).

Good adhesion of BALB/3T3 fibroblasts was achieved on flat films of RGD-modified eADF4(C16). On such ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) films, BALB/3T3 fibroblasts showed a spread morphology (Fig. 3B), and the proliferation rate and doubling time were similar to those of the positive control (treated cell culture plates).<sup>8</sup>

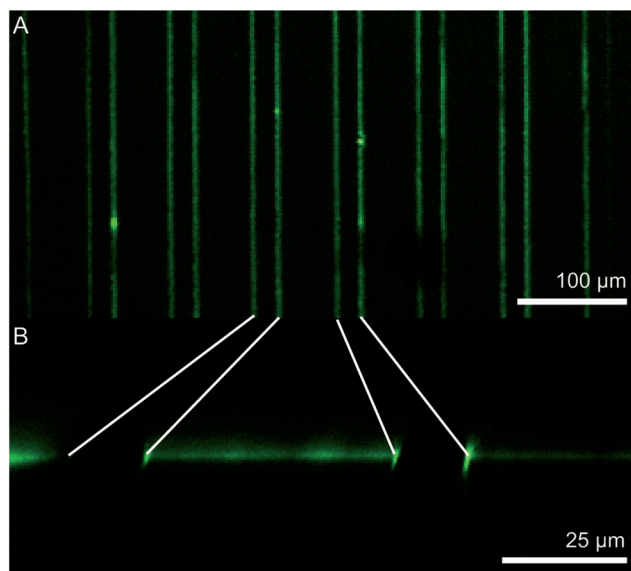
Films made of the recombinant lacewing egg stalk protein N[AS]<sub>8</sub>C showed a low surface roughness similar to films made of eADF4(C16), and fibroblast adhesion was very low on such films (Fig. 3C).

Concomitantly, C2C12 myoblasts showed a similar behaviour on all three film types (Fig. 3D–F). On eADF4(C16) films as well as on N[AS]<sub>8</sub>C films, myoblasts revealed a spherical morphology and adhered weakly to the surface (Fig. 3D and F). The modification of eADF4(C16) with an RGD peptide resulted in spread morphology with improved cell adhesion (Fig. 3E).

### Production of patterned films

To promote cell alignment on our silk film surfaces, patterned two-layer films made of various combinations of eADF4(C16), N[AS]<sub>8</sub>C, and ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) were processed.





**Fig. 4** Fluorescence microscopic images of a patterned film with fluorescein-coupled N[AS]<sub>8</sub>C protein as ridges (A: top view; B: side view). The gaps between ridges are clearly visible in B.

The width between the ridges was adjusted to 20 μm, since widths between 10 μm and 20 μm were previously shown to be suitable for cell alignment, and the ridges had a width of 50 μm.<sup>15</sup>

In order to visualise the film patterns, N[AS]<sub>8</sub>C was chemically labelled with fluorescein before film formation. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) of structured films with the labelled protein revealed a precise alignment of the two protein layers (Fig. 4A) and a thickness of the N[AS]<sub>8</sub>C layer (*i.e.* the height of the ridges) of less than one micron (Fig. 4B).

First a ground layer was made of ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) with good cell adhesion properties, and ridges were processed thereon using N[AS]<sub>8</sub>C with low adhesion properties. Next, films with eADF4(C16) as the ground layer and N[AS]<sub>8</sub>C as ridges were produced (Fig. 1B).

## Fibroblast growth on patterned films

**Single protein films.** BALB/3T3 fibroblasts were grown on patterned films made of eADF4(C16) (in ground and ridge layers) to confirm the influence of the structure on the adhesion and alignment of cells.

Cell adhesion was improved compared to unstructured films due to the rough edges of the structures. The orientation of the cells was measured after 48 hours and revealed a good alignment with the film structures (Fig. 5A). Cells adhered everywhere but with 63.2% of the cells in the grooves (Table 1).

Cell adhesion on N[AS]<sub>8</sub>C films could not be quantified, since only a few cells adhered and were oriented with the axis of the ridges.

ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) structured films showed no improved adhesion in comparison to unstructured ones due to the already high level of adhesion on the flat films.

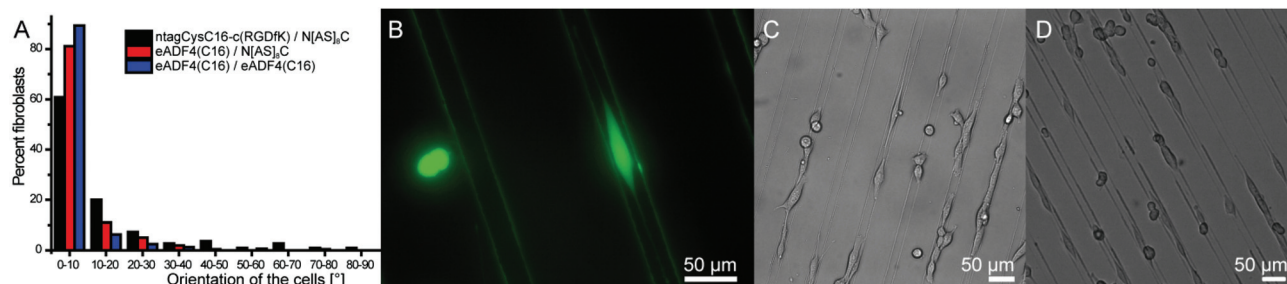
Unfortunately, structured films made of one protein by this technique are highly unstable due to the identical charge of the proteins in both layers, and, therefore, the ridges peel off easily (ESI Fig. 1†).

**Two protein films.** Generating stable films was possible using two proteins with opposite charges. We used RGD modified silk (ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK)) promoting fibroblast attachment as a ground layer and positively charged N[AS]<sub>8</sub>C prohibiting efficient fibroblast attachment for making the ridges (Fig. 5B).

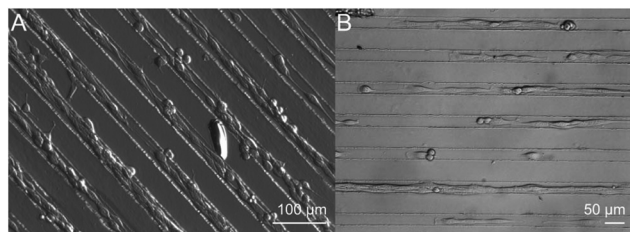
On such films, 85.5% of the fibroblasts adhered on the ground layer (94.2% when standardised per area due to the

**Table 1** Distribution of fibroblasts on patterned films, consisting of two independent proteins. Most cells spread within the grooves. The first protein reflects the ground layer and the second the ridge material.

	ntag <sup>Cys</sup> C16-c(RGDfK)/N[AS] <sub>8</sub> C	eADF4(C16)/N[AS] <sub>8</sub> C	eADF4(C16)/eADF4(C16)
Cells in the grooves	85.5%	78.8%	63.2%
Cells standardised per area in the grooves	94.2%	91.5%	85.3%



**Fig. 5** BALB/3T3 fibroblasts grown on structured films. A: orientation of fibroblasts grown on patterned films made of different protein combinations (ground layer protein/ridge protein) as depicted by the colour code after 48 hours of incubation; B: fluorescence microscopy of calcein AM stained cells, grown on a film with ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) as the ground layer and N[AS]<sub>8</sub>C as ridges; C and D: light microscopic image after 48 hours of incubation using ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) as the ground layer with N[AS]<sub>8</sub>C as ridges (C) and eADF4(C16) as the ground layer with N[AS]<sub>8</sub>C as ridges (D).



**Fig. 6** A: BALB/3T3 fibroblasts grown on structured films using eADF4(C16) as the ground layer and N[AS]<sub>8</sub>C as ridges after 96 hours of incubation; B: C2C12 myoblasts grown on eADF4(C16)/N[AS]<sub>8</sub>C films after 48 hours of incubation.

2.5 times larger area of the top layer), and most of the cells aligned along the axis of the ridges (Table 1, Fig. 5A, 5C and ESI Fig. 2†). Even the few cells adhering to the N[AS]<sub>8</sub>C ridges were mostly aligned.

Surprisingly, control experiments using eADF4(C16) instead of ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) as the ground layer revealed similar results (Fig. 5D), with much higher cell adhesion numbers than for eADF4(C16)/eADF4(C16) films. The fibroblasts mostly grew on the eADF4(C16) area (78.8% of the fibroblasts (91.5% calculated per area)) and not on the N[AS]<sub>8</sub>C ridges (Table 1). Cell alignment was pronounced as well (Fig. 5A) accentuating the importance of substrate morphology for cell attachment. The adhesion of fibroblasts on eADF4(C16) films is much better on structured films than on flat ones (Fig. 3A), probably due to the microstructure at the interface of the two layers, which results from drying effects. In contrast, N[AS]<sub>8</sub>C seems to be a good ridge material as it is not a good substrate for cells, and, therefore, it directs cell adhesion to the desired ground layer areas. Images after 96 hours showed that cells proliferated well on the films and stayed on the ground protein layer as desired (Fig. 6A).

In summary, structures are important for orientation of cells even if they are less than 1 μm in height (Fig. 4B).

### Myoblast growth on patterned films

C2C12 myoblasts grown on patterned films made of ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK)/N[AS]<sub>8</sub>C and eADF4(C16)/N[AS]<sub>8</sub>C behaved similar to fibroblasts (Fig. 6B). C2C12 myoblasts mostly grew on the spider silk ground layers and not on the N[AS]<sub>8</sub>C ridges.

It was impossible to calculate the cell angle and distribution due to the high cell density after 48 hours and the formation of myotubes.

The formation of myotubes in an aligned manner, however, is an important step towards skeletal muscle regeneration.

## Conclusion

The beneficial influence of patterned scaffolds on fibroblast and myoblast adhesion and alignment was shown by our experiments with patterned films using one single protein. Fibroblasts as well as myoblasts adhere and proliferate much

better on structured than on unstructured films made of the same protein. A width of 20 μm between ridges with a height of 1 μm is suitable to induce fibroblast as well as myoblast alignment in parallel to the grooved pattern (Fig. 5 and 6). On patterned eADF4(C16) films, fibroblasts grew on the ridges and in the grooves with slight preferences for the grooves. The deposition of N[AS]<sub>8</sub>C as stripe protein (ridges) with low fibroblast and myoblast adhesion properties increased cell binding in the grooves. Surprisingly, ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK) as the ground layer did not result in a significantly better cell binding compared to an eADF4(C16) ground layer. The unspecific cell adhesion, induced by surface roughness and structure, leads to strong cell adhesion in the case of the polyanionic spider silk proteins, but not in the case of the polycationic egg stalk silk protein. Surprisingly, in this context the specific interaction of the cells with RGD did not show significant benefits for patterned spider silk films.

In the future, our results will have an impact on patterning of silk coatings *e.g.* for bone grafts, muscle cell cultures, or nerve guidance/regeneration.<sup>13,14</sup>

## Acknowledgements

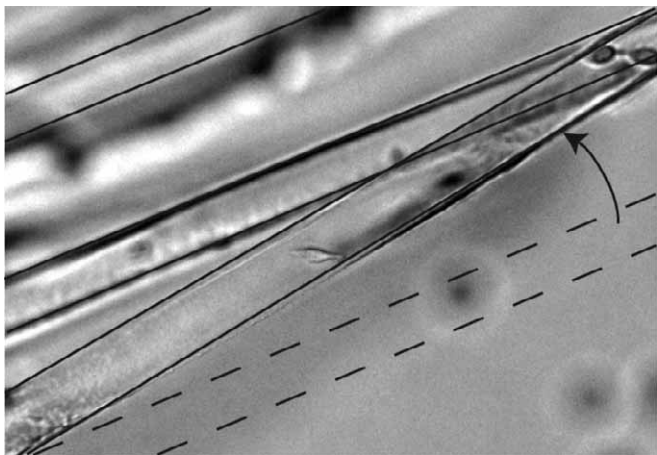
The authors thank Aniel Heidebrecht for the CLSM images, Martin Trebbin for the silicon wafer template and Martin Humenik for critically reading the manuscript. This work was supported by the DFG SCHE603/4 and the Bavarian State Ministry of the Environment and Public Health (U8793-2012/6-2).

## Notes and references

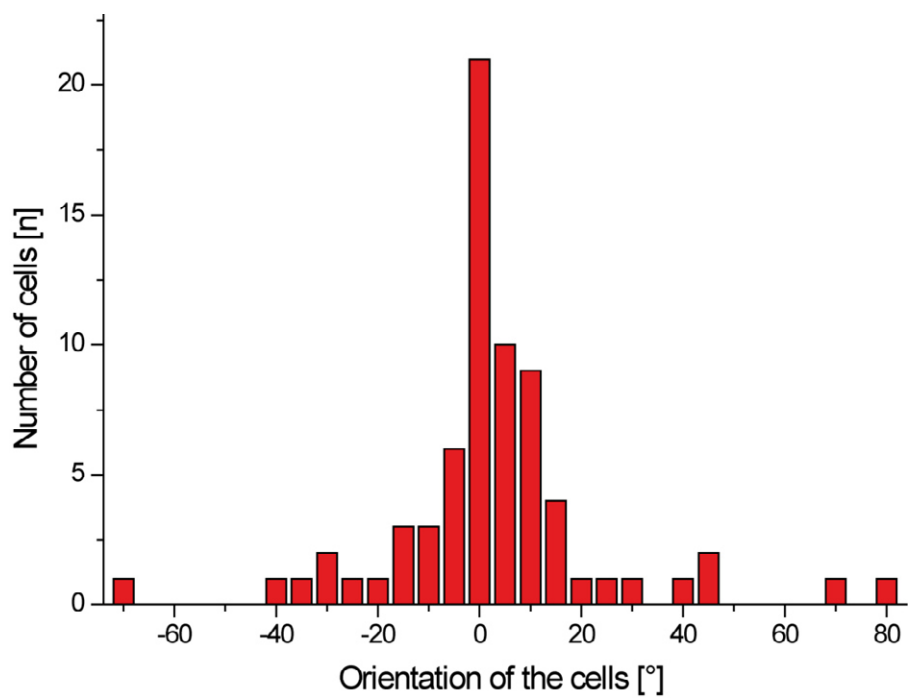
- 1 M. Heim, L. Romer and T. Scheibel, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 156–164.
- 2 A. Heidebrecht and T. Scheibel, *Adv. Appl. Microbiol.*, 2013, **82**, 115–153.
- 3 J. G. Hardy, L. M. Romer and T. R. Scheibel, *Polymer*, 2008, **49**, 4309–4327.
- 4 J. G. Hardy and T. R. Scheibel, *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 2009, **47**, 3957–3963.
- 5 A. Leal-Egana, G. Lang, C. Mauerer, J. Wickinghoff, M. Weber, S. Geimer and T. Scheibel, *Adv. Eng. Mater.*, 2012, **14**, B67–B75.
- 6 E. S. Gil, B. B. Mandal, S. H. Park, J. K. Marchant, F. G. Omenetto and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2010, **31**, 8953–8963.
- 7 E. Bini, C. W. Foo, J. Huang, V. Karageorgiou, B. Kitchel and D. L. Kaplan, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 3139–3145.
- 8 S. Wohlrab, S. Muller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egana and T. Scheibel, *Biomaterials*, 2012, **33**, 6650–6659.
- 9 A. Leal-Egana and T. Scheibel, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 14330–14336.

- 10 E. S. Gil, S. H. Park, J. Marchant, F. Omenetto and D. L. Kaplan, *Macromol. Biosci.*, 2010, **10**, 664–673.
- 11 J. Torbet, M. Malbouyres, N. Builles, V. Justin, M. Roulet, O. Damour, A. Oldberg, F. Ruggiero and D. J. Hulmes, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4268–4276.
- 12 B. D. Lawrence, J. K. Marchant, M. A. Pindrus, F. G. Omenetto and D. L. Kaplan, *Biomaterials*, 2009, **30**, 1299–1308.
- 13 D. Yucel, G. T. Kose and V. Hasirci, *Biomacromolecules*, 2010, **11**, 3584–3591.
- 14 D. Yucel, G. T. Kose and V. Hasirci, *Biomaterials*, 2010, **31**, 1596–1603.
- 15 J. L. Charest, A. J. Garcia and W. P. King, *Biomaterials*, 2007, **28**, 2202–2210.
- 16 J. T. Zhang, J. Q. Nie, M. Muhlstadt, H. Gallagher, O. Pullig and K. D. Jandt, *Adv. Funct. Mater.*, 2011, **21**, 4079–4087.
- 17 S. Fujita, M. Ohshima and H. Iwata, *J. R. Soc. Interface*, 2009, **6**((Suppl 3), S269–S277.
- 18 B. Zhu, Q. Lu, J. Yin, J. Hu and Z. Wang, *Tissue Eng.*, 2005, **11**, 825–834.
- 19 T. C. McDevitt, K. A. Woodhouse, S. D. Hauschka, C. E. Murry and P. S. Stayton, *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2003, **66**, 586–595.
- 20 A. W. Feinberg, A. Feigel, S. S. Shevkoplyas, S. Sheehy, G. M. Whitesides and K. K. Parker, *Science*, 2007, **317**, 1366–1370.
- 21 H. Fujita, K. Shimizu and E. Nagamori, *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, **103**, 1034–1041.
- 22 D. Huemmerich, U. Slotta and T. Scheibel, *Appl. Phys. A: Mater.*, 2006, **82**, 219–222.
- 23 K. Spiess, S. Wohlrab and T. Scheibel, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4168–4174.
- 24 K. Spiess, R. Ene, C. D. Keenan, J. Senker, F. Kremer and T. Scheibel, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 13594–13604.
- 25 S. Wohlrab, K. Spiess and T. Scheibel, *J. Mater. Chem.*, 2012, **22**, 22050–22054.
- 26 D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph and T. Scheibel, *Biochemistry*, 2004, **43**, 13604–13612.
- 27 F. Bauer and T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 6521–6524.

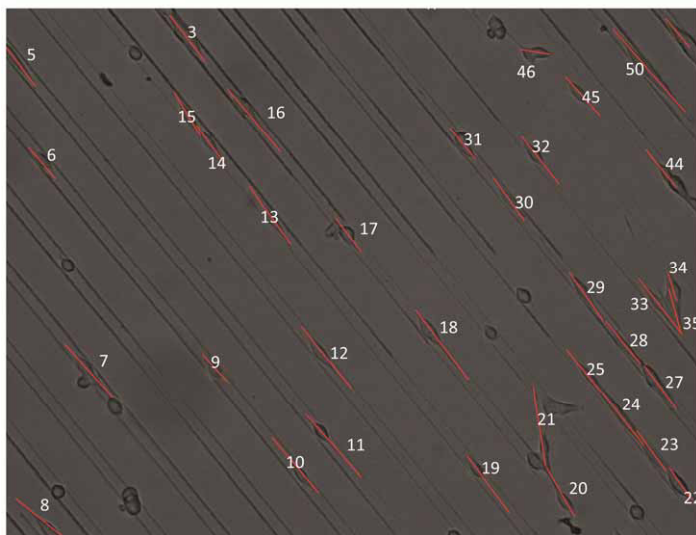




Supplemental Figure 1: Stripes easily peel off eADF4(C16)/eADF4(C16) structured films. The arrow is indicating the movement of the stripe.



Supplemental Figure 2: Distribution of the cell alignment of fibroblasts on a ntag<sup>Cys</sup>C16-c(RGDfK)/N[AS]<sub>8</sub>C film.



**Supplemental Figure 3: Picture analysis of a eADF4(C16)/ N[AS]<sub>8</sub>C (ground layer protein/ ridge protein) patterned film to calculate the orientation and distribution of the cells. All adhered cells were marked along the longest axis of the spread cells indicative of their orientation.**

### TEILARBEIT III

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in *Journal of Materials Chemistry* veröffentlicht als:

"Varying surface hydrophobicities of coatings made of recombinant spider silk proteins."

Wohlrab, S. \*, Spiess, K. \*, and Scheibel, T.

Reproduziert aus *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22(41): 22050-22054 mit freundlicher Genehmigung des Verlages The Royal Society of Chemistry.

\* gleichberechtigte Co-Autorenschaft

## Varying surface hydrophobicities of coatings made of recombinant spider silk proteins

Stefanie Wohlrab,<sup>†</sup> Kristina Spieß<sup>†</sup> and Thomas Scheibel<sup>\*</sup>

Received 30th July 2012, Accepted 6th September 2012

DOI: 10.1039/c2jm35075k

The engineered spider silk protein eADF4(C16) reveals similarities to amphiphilic block copolymers. Drop cast of protein solutions on different hydrophobic as well as hydrophilic templates out of different starting solvents (hexafluoroisopropanol, formic acid and aqueous buffers) generated silk films varying in structure and surface properties. Here, the underlying secondary structure of the proteins, the mechanical integrity at increased temperatures, homogeneity and surface topography of silk films, as well as the wettability were investigated in detail. Interestingly, the used templates had impact on microphase separation of the silk molecules as seen by the content of  $\beta$ -sheet structures; as well as on silk film surface hydrophobicities.

## Introduction

Many features of a material, such as wettability or biocompatibility, are determined by its surface. To control interactions of a material with the surrounding environment it is often necessary to modify its surface. Coating of the surface is one possibility to create defined physical and chemical properties. One possibility to coat a substrate is to use self-assembled monolayers (SAMs) of amphiphilic organic molecules and another one is the use of multilayer films.<sup>1,2</sup> Multilayer films of polypeptides are suitable for applications which encompass some of the following desirable features: anti-fouling, biocompatibility, biodegradability, specific bio-molecular sensitivity, environmental benignity, thermal responsiveness, and stickiness or non-stickiness.<sup>3–6</sup> Coatings made of silk proteins can address some of these issues by virtue of the biochemical nature of the silk proteins. Especially, spider dragline silk which builds the frame and the radii of a spider web is a promising material for biomedical and technical applications.<sup>7</sup> Two so far identified components of the dragline silk of the European Garden spider, *A. diadematus*, are *Araneus diadematus* fibroin 3 (ADF3) and *Araneus diadematus* fibroin 4 (ADF4), which resemble amphiphiles with blocks of polyalanine and glycine-rich blocks.<sup>8</sup> The polyalanines adopt  $\beta$ -sheet structures which are thought to be responsible for the high tensile strength<sup>9</sup> in fibres, while the glycine-rich blocks form helical structures or random coil elements, being important for the flexibility and elasticity of fibres.<sup>10</sup>

In contrast to nature, where spider dragline silk proteins are exclusively converted into threads, *in vitro* it is possible to

produce other two- or three-dimensional shapes, such as *e.g.* hydrogels,<sup>11</sup> films<sup>12</sup> or microparticles.<sup>13</sup> Here, we intended to create biocompatible surfaces with defined wettability, based on the previously established engineered spider silk protein eADF4(C16). The hydrophilic material glass as well as the technically important hydrophobic substrates polystyrene and Teflon (PTFE) were chosen as model templates. Additionally, different starting solvents such as hexafluoroisopropanol (HFIP), formic acid (FA) and aqueous buffers were investigated, since they have an influence on the structure and mechanical properties of spider silk films.<sup>14,15</sup>

## Experimental

## Film preparation

The recombinant spider silk protein eADF4(C16), which consists of 16 repeats of the C module (GSSAAAAAASGPGGYG PENQGSPGPGGYGPGGP), was produced and purified as described previously.<sup>16</sup> The purified and lyophilized protein was directly dissolved in hexafluoroisopropanol (HFIP) or formic acid (FA). To generate an aqueous solution, eADF4(C16) was dissolved in 6 M guanidiniumthiocyanate and dialyzed against aqueous buffer. Ammonium bicarbonate was chosen as the buffer system, since it decomposes into the volatile components NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O upon evaporation. The obtained protein solutions were cast on polystyrene, polytetrafluoroethylene (PTFE) and glass. Since the water content has a large influence on spider silk films, the environmental conditions were kept constant at 30% relative humidity and 20 °C. After evaporation of the solvent the films were treated with methanol to stabilize the films by inducing  $\beta$ -sheet structures as described previously.<sup>17</sup> For contact angle measurements, FTIR analysis, and enzymatic digestion, silk films with a thickness of approximately 1  $\mu$ m were

Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften, Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth, Universitätsstr.30, D-95440 Bayreuth, Germany. E-mail: Thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de; Fax: +49 921 55 7346; Tel: +49 921 55 7361

<sup>†</sup> These authors contributed equally.

employed. For dynamic mechanical analysis, films with a thickness of 9–11  $\mu\text{m}$  were used.

### Atomic force microscopy

For surface morphology characterization, films were analysed in tapping mode using a Dimension™ 3100 Nanoscope IV (Veeco Instrument Inc., N.Y., USA).  $\text{Si}_3\text{N}_4$  cantilevers (Olympus, Tokyo, Japan) were used with a force constant of  $42 \text{ N m}^{-1}$ . The average roughness  $R_a$  was calculated in an area of  $25 \mu\text{m}^2$ .

### Contact angle measurements

To analyse the wettability, static contact angles of water on spider silk films were analysed using the OCA contact angle system (Dataphysics Instruments GmbH, Germany). The contact angles were determined using the SCA20 software (Dataphysics Instruments GmbH, Germany) and a Laplace Young fit. Since as-cast HFIP and aqueous films partially dissolve in water, only post-treated films were characterized.

### Film digestion

Silk films were covered with chymotrypsin (Roth, Karlsruhe, Germany) in solution ( $9 \text{ U ml}^{-1}$  in  $100 \text{ mM}$  Tris,  $10 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 7.8). After 24 h of incubation at  $37^\circ\text{C}$ , the films were washed with distilled water to remove the enzyme, dried, and analysed by scanning electron microscopy (SEM).

### Attenuated total reflections-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy

ATR-FTIR spectra were obtained on a Ge crystal in absorbance mode using a Bruker Tensor 27 spectrometer (Bruker, Germany) between  $3500 \text{ cm}^{-1}$  and  $750 \text{ cm}^{-1}$ . Each measurement reflects 60 scans at a resolution of  $2 \text{ cm}^{-1}$ . To determine the fractions of individual secondary structures, the amide I region ( $1595 \text{ cm}^{-1}$  to  $1705 \text{ cm}^{-1}$ ) was analysed by Fourier self-deconvolution (FSD) using the Opus software (Bruker Optics Corp., Billerica, MA, USA) according to Hu *et al.*, 2006.<sup>18</sup>

### Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy was performed with a 1450EsB Cross Beam (Zeiss, Germany) at an accelerating voltage of  $3 \text{ kV}$ . After digestion with chymotrypsin the dried silk films were sputtered with platinum and analysed directly.

### Dynamic mechanical analysis (DMA)

Dynamic mechanical analysis was performed with a DMA 2980 (TA Instruments, Newcastle, DE, USA). A frequency of  $5 \text{ Hz}$ , a heat rate of  $2^\circ\text{C min}^{-1}$ , and an amplitude of  $0.08\%$  (relative to the initial sample length) were used.

## Results and discussion

### Characterization of the silk films

Silk protein films were cast from different solvents on PTFE, glass and polystyrene, and the homogeneity and the surface topography of substrates were analysed by atomic force

microscopy (AFM); followed by calculation of the average roughness  $R_a$ . Depending on the solvent and the template, the average roughness of the silk films varied in a range from  $1.2$  to  $27.5 \text{ nm}$  (within an area of  $25 \mu\text{m}^2$ ) (Table 1). HFIP and formic acid films cast on a glass surface revealed a slightly wavy, relatively smooth surface, whereas films cast on polystyrene were plane with small “spikes”. The films cast on PTFE showed a more homogeneous appearance, however, with a higher roughness than films on glass or polystyrene. In contrast to HFIP and FA films, which showed a homogeneous smooth surface, those cast from aqueous solutions were relatively rough and had a peak-shaped structure.

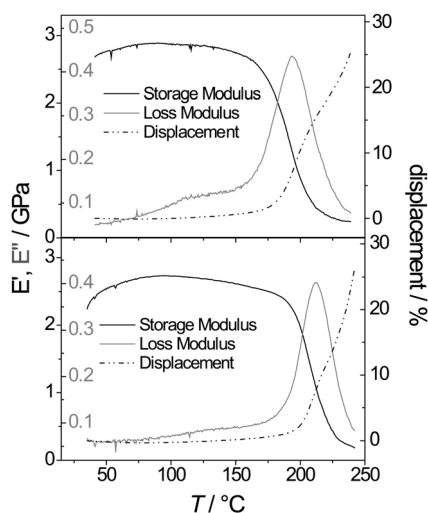
In order to test the stability of the films dynamic mechanical analysis (DMA) was employed. The storage moduli  $E'$  and loss moduli  $E''$  similarly changed in all films with increasing temperature. DMA curves for as-cast and methanol-treated films cast from formic acid are shown as typical examples in Fig. 1. At temperatures  $<100^\circ\text{C}$  a strain hardening effect was observed due to water/solvent loss. Up to temperatures of around  $175\text{--}205^\circ\text{C}$  (depending on the solvent/post-treatment) the initial high storage modulus and the loss modulus slightly changed (Table 2, Fig. 1), followed by a sharp decrease of approximately one order of magnitude in  $E'$  and  $E''$ . The reached maximum reflected a glass transition-like behaviour with a sudden gain in segmental motion of the protein chains accompanied by a remarkable elongation of the films. A direct correlation between the moduli, the glass transition temperature  $T_g$  and the secondary structure was observed. An increase in the  $\beta$ -sheet content from  $20\%$  (in as cast HFIP films) to  $\geq 40\%$  (in methanol treated films) resulted in an increase in moduli and an upward shift in  $T_g$  of  $\sim 50^\circ\text{C}$ , indicating an increase in stability in the case of  $\beta$ -sheet enriched films.

### Wetting behaviour of silk films

The surface hydrophobicity is important for a material's interaction with its environment. Therefore, the water contact angles (CA) were analysed of the film–air interface. HFIP films made on polystyrene revealed a film–air water contact angle of  $38.4^\circ \pm 6.9^\circ$ , being more hydrophilic than that of aqueous films ( $48.2^\circ \pm 5.8^\circ$ ) and FA films ( $63.0^\circ \pm 4.3^\circ$ ). All films rendered the polystyrene surface more hydrophilic when compared to the uncoated template surface, which displayed a water contact angle of  $89.4^\circ \pm 1.1^\circ$  (Fig. 2A). Additionally, air contact angles of films cast on glass, a more hydrophilic substrate, and of films cast on Teflon, a hydrophobic and technically important substrate, were tested. Strikingly, the surface hydrophobicities of

**Table 1** Average roughness  $R_a/\text{nm}$  of eADF4(C16) films was determined by AFM (measured in an area of  $25 \mu\text{m}^2$ ). Films were cast from HFIP, FA or aqueous buffer ( $10 \text{ mM}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) on polystyrene (PS), glass or Teflon (PTFE) and analysed after subsequent processing with methanol

	Average roughness $R_a/\text{nm}$			
	HFIP	FA	Aqueous	Uncoated
Glass	$1.27 \pm 0.48$	$1.21 \pm 0.41$	$8.27 \pm 0.94$	$1.02 \pm 0.21$
PS	$1.97 \pm 0.65$	$4.73 \pm 2.01$	$12.24 \pm 2.71$	$6.16 \pm 1.01$
PTFE	$10.00 \pm 2.50$	n.d.	$27.50 \pm 4.80$	$23.30 \pm 6.55$



**Fig. 1** Storage modulus  $E'$ , loss modulus  $E''$  and change in the sample length (displacement) of eADF4(C16) films. Exemplary films cast from formic acid, before (upper panel) and after methanol (MeOH) treatment (lower panel) are shown. Dynamic mechanical analysis was performed with a frequency of 5 Hz, a heat rate of  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , and an amplitude of 0.08% (relative to the initial sample length).

all coated templates were inverted in comparison to plain template surfaces (non-coated). This trend was visible for films cast from every solvent, with air-surfaces of HFIP films yielding the smallest and FA films the highest (except on glass) water contact angles. Due to the higher roughness of the aqueous films on glass, the films showed increased contact angles. In the case of PTFE ( $CA = 104.5^{\circ} \pm 3.1^{\circ}$ ) the air-surface of silk films was hydrophilic ( $CA = 41\text{--}59.2^{\circ}$ ), while in the case of glass ( $CA = 28.2^{\circ} \pm 1.3^{\circ}$ ) it was hydrophobic ( $CA = 62.1\text{--}113.4^{\circ}$ ) (Fig. 2A). In addition to the hydrophobicity of the silk film–air interface, the water contact angles of film–template interfaces were analysed. For example HFIP films on PTFE with a hydrophilic air surface ( $CA = 41.7^{\circ} \pm 6.3^{\circ}$ ) had a more hydrophobic template surface with water contact angles of  $74.4^{\circ} \pm 5.8^{\circ}$  (Fig. 2B and C).

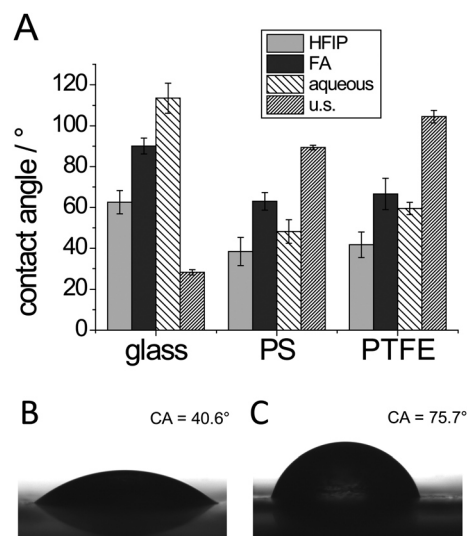
### Secondary structure analysis of the silk films

Next, we analysed structural differences of the silk films by ATR-FTIR. In the achieved FTIR spectra, the amide I band which represents mainly C=O stretching vibrations of the amide backbone and the amide II band which corresponds to N–H bending vibrations were both analysed in detail. The  $\beta$ -sheet content of silk films is highly dependent on the solvent used.

**Table 2** Overview of mechanical characteristics (onset drop in storage modulus  $E'$  and max. loss modulus  $E''/^{\circ}\text{C}$ ) of eADF4(C16) films. Dynamic mechanical analysis was performed with a frequency of 5 Hz, a heat rate of  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , and an amplitude of 0.08% (relative to the initial sample length)

	Temperature/ $^{\circ}\text{C}$					
	HFIP		FA		Aqueous	
	As cast	MeOH	As cast	MeOH	As cast	MeOH
Onset drop in $E'$	$151.8 \pm 6.0$	$204.5 \pm 6.5$	$174.5 \pm 0.3$	$193.5^a$	$185.3 \pm 0.6$	$198.6 \pm 1.7$
Max. $E''$	$163.0 \pm 8.4$	$213.5^a$	$193.5 \pm 1.5$	$212.2^a$	n.d.	$213.4 \pm 3.8$

<sup>a</sup> Single measurements.

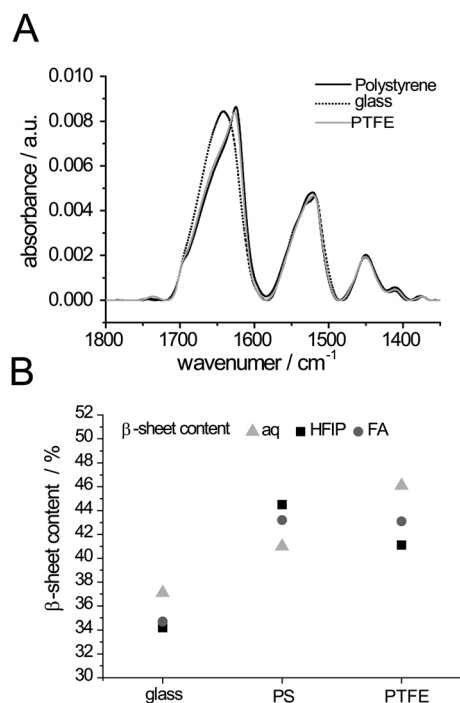


**Fig. 2** (A) Surface hydrophobicity of eADF4(C16) films determined by water contact angle measurements. Films were cast on polystyrene, glass or Teflon from HFIP, FA or aqueous buffer (10 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) and analysed after subsequent processing with methanol. As reference, the contact angles of uncoated substrates (u.s.) were determined ( $28.2 \pm 1.3^{\circ}$  for glass,  $89.4 \pm 1.1^{\circ}$  for PS, and  $104.5 \pm 3.1^{\circ}$  for Teflon). Exemplary water contact angles are shown of the air surface (B) and the template surface (C) of eADF4(C16) films cast from HFIP on Teflon after methanol treatment.

Fluorinated alcohols, like HFIP, are known to induce an  $\alpha$ -helical structure, thus silk proteins dissolved in HFIP show a significantly higher helical content.<sup>19,15</sup> In contrast, formic acid induces  $\beta$ -sheet structures by interaction with the polar side chains of proteins.<sup>21</sup>

Surprisingly, films cast on hydrophilic substrates showed significant differences to films cast on hydrophobic substrates independent of the solvent used (Fig. 3A). The fraction of individual secondary structures was determined by Fourier Self-Deconvolution (FSD) of the amide I band, as described previously by Hu *et al.*<sup>18</sup> On the hydrophobic substrates PTFE and polystyrene silk films showed significantly higher levels of  $\beta$ -sheet structures (41–46%) than films cast on glass, which had a  $\beta$ -sheet content of 34–37% (Fig. 3B). In the case of films cast on glass, the amphiphilic silk proteins form hydrogen bonds with the glass influencing the methanol induced  $\beta$ -sheet shift of the silk structure. On the hydrophobic substrates polystyrene and PTFE the  $\beta$ -sheet content of silk films is consequently higher. The difference in  $\beta$ -sheet content of silk films on polystyrene and PTFE is not significant.

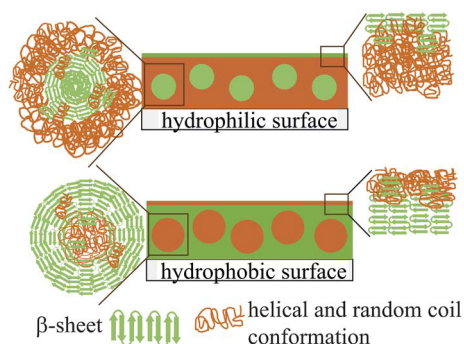




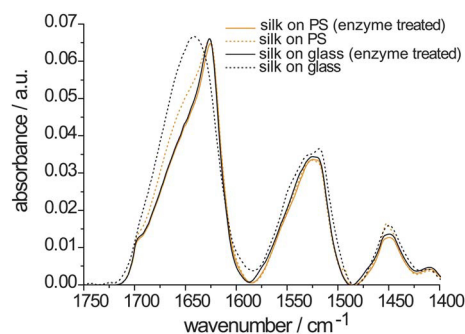
**Fig. 3** Influence of template and starting solvent on the secondary structure of eADF4(C16) films. (A) After methanol treatment, the films were analysed by FTIR spectroscopy (exemplary films cast from HFIP are shown). (B) β-sheet content of eADF4(C16) films. Films were cast on either glass, polystyrene (PS) or Teflon from HFIP (squares), FA (circles) or aqueous buffer (triangle).

### Microphase separation of silk proteins

In polymer chemistry it is well known that block copolymers will arrange differently depending on their composition. Because of the thermodynamic incompatibility of the different blocks, the contact between similar/dissimilar blocks is maximized/minimized; and the self-assembly in micro-domains occurs.<sup>21</sup> Such microphase separation effects have already been observed for the naturally occurring spider dragline silk, for engineered spider silk proteins,<sup>22,23</sup> for multi-block copolymers based on spider silk proteins,<sup>24,25</sup> for cast silk fibroin drops<sup>26</sup> and for silk fibroin<sup>27</sup>



**Fig. 4** Influence of the template on the secondary structure of eADF4(C16). A hydrophilic substrate leads to less β-sheet structures, but β-sheet exposure at the film–air surface, thus inducing a hydrophobic film surface. In contrast, the air-surface of films on hydrophobic substrates is more hydrophilic. Although a higher overall β-sheet content is induced on such surface, most β-sheets are incorporated within the films.



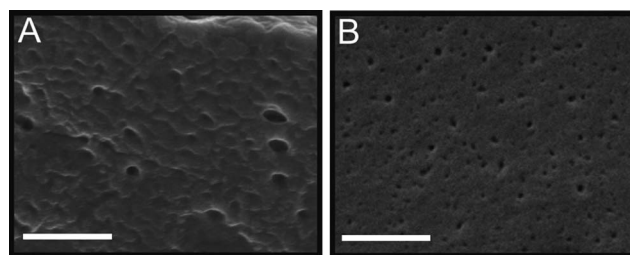
**Fig. 5** ATR-FTIR-spectra of silk films cast from HFIP on polystyrene (orange) and from aqueous buffer on glass (black) before (solid lines) and after chymotrypsin treatment (dotted lines).

films, where β-sheet crystallites are dispersed in an amorphous matrix.<sup>28</sup>

Based on the existing evidences we generated a structural model for silk coating on surfaces based on self-assembled micro-domains (Fig. 4). To experimentally confirm the descriptive model of the result of microphase separation, the silk films were digested with chymotrypsin. Previously it had been shown that α-chymotrypsin degrades the non-crystalline parts of silk proteins faster than the β-sheet crystals.<sup>29</sup> Therefore, the percent content of β-sheet structures should increase upon α-chymotrypsin treatment. This increase in β-sheet content was indeed seen for silk films treated with chymotrypsin, in dependence of the template the silk film was cast on and as confirmed by FTIR analysis (Fig. 5, Table 3). In the case of films on polystyrene the percent β-sheet content increased after enzyme treatment from 41.0% to 46.5% and in the case of glass from 35.7% to 45.9%.

Further, the surface morphology of the enzyme-treated films was analysed by scanning electron microscopy (SEM). Films cast on polystyrene had a smooth surface with small pinholes, indicative of a β-sheet rich surface with small helical inclusions of 50 to 150 nm in diameter. On glass, the silk surface was much rougher after α-chymotrypsin treatment with particulate structures (Fig. 6).

We assume that the phase separation is based on the amphiphilic nature of the silk proteins.<sup>30</sup> Their poly-alanine stretches can be considered as non-hydrophilic blocks (close interaction, water exclusion), whereas glycine-rich regions can be regarded as hydrophilic blocks. A hydrophilic template, *e.g.* glass, leads to hydrophobic silk patches (like coalesced micelles) surrounded by more hydrophilic amino acids. Drying of the film and subsequent treatment with methanol induce the folding of the poly-alanines into β-sheet crystallites, whereas glycine-rich motifs remain



**Fig. 6** Scanning electron microscopy (SEM) images of chymotrypsin treated silk films on glass (A) and polystyrene (B). Scale bar 1 μm.

**Table 3** The percent  $\beta$ -sheet content of silk films (untreated and enzyme treated) was determined by Fourier Self Deconvolution (FSD) of the amide I band

	$\beta$ -sheet content/%	
	Silk film	Enzyme treated silk film
Polystyrene	$41.0 \pm 0.3$	$46.5 \pm 1.4$
Glass	$35.7 \pm 1.7$	$45.9 \pm 0.3$

unstructured or in helical (polyproline II) conformations. At the film–air interface the hydrophobic patches are preferentially oriented towards air instead of the mainly hydrophilic bulk, leading to a film surface which appears to be more hydrophobic.

Protein films cast on a hydrophobic substrate consist to a higher degree of  $\beta$ -sheets, which render the bulk of the film more hydrophobic. The hydrophilic areas consisting of random coil and helical conformations are dispersed therein. At the silk–air interface hydrophilic parts orient towards air instead of the hydrophobic core; and the surface appears to be more hydrophilic being more sensitive to chymotrypsin digestion.

## Conclusions

In summary, we have shown that not only the starting solvent but also the template surface has a significant influence on the properties of drop cast recombinant spider silk films and coatings. The observed possibility to control surface wettability of the films presents a high potential for these coatings in technical and medical fields. Due to the limited bonding ability, silk films can easily be peeled off the hydrophobic surfaces. Since recombinant spider silk proteins can be easily functionalized, introduction of functional groups on a template's surface would allow specific chemical bonding between the template surface and the silk film.<sup>12</sup> Together with the biocompatibility, the biodegradability and the opportunity of chemical modification, spider silk coatings can for example be used for the optimization or minimization of protein adsorption and cell growth on synthetic biomaterials.<sup>12,31,32</sup>

## Acknowledgements

This work was supported by SFB 840 A8. The authors would like to thank Markus Hund for technical support on AFM measurements and Andrew Smith, Martin Humenik, Lukas Eisoldt and Claudia Blüm for scientific discussions.

## Notes and references

- 1 M. J. Pellerite, E. J. Wood and V. W. Jones, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 4746–4754.
- 2 G. Decher, *Science*, 1997, **277**, 1232–1237.
- 3 D. T. Haynie, L. Zhang, J. S. Rudra, W. H. Zhao, Y. Zhong and N. Palath, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 2895–2913.
- 4 F. Boulmedais, V. Ball, P. Schwinte, B. Frisch, P. Schaaf and J. C. Voegel, *Langmuir*, 2003, **19**, 440–445.
- 5 M. Golonka, M. Bulwan, M. Nowakowska, A. M. Testera, J. C. Rodriguez-Cabello and S. Zapotoczny, *Soft Matter*, 2011, **7**, 9402–9409.
- 6 B. Y. Li and D. T. Haynie, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1667–1670.
- 7 K. Spiess, A. Lammel and T. Scheibel, *Macromol. Biosci.*, 2010, **10**, 998–1007.
- 8 S. Winkler and D. L. Kaplan, *J. Biotechnol.*, 2000, **74**, 85–93.
- 9 B. L. Thiel and C. Viney, *Science*, 1996, **273**, 1480–1481.
- 10 A. E. Brooks, H. B. Steinkraus, S. R. Nelson and R. V. Lewis, *Biomacromolecules*, 2005, **6**, 3095–3099.
- 11 K. Schacht and T. Scheibel, *Biomacromolecules*, 2011, **12**, 2488–2495.
- 12 K. Spiess, S. Wohlrab and T. Scheibel, *Soft Matter*, 2010, **6**, 4168–4174.
- 13 U. K. Slotta, S. Rammensee, S. Gorb and T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 4592–4594.
- 14 U. Slotta, M. Tammer, F. Kremer, P. Koelsch and T. Scheibel, *Supramol. Chem.*, 2006, **18**, 465–471.
- 15 K. Spiess, R. Ene, C. D. Keenan, J. Senker, F. Kremer and T. Scheibel, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 13594–13604.
- 16 D. Huemmerich, C. W. Helsen, S. Quedzuweit, J. Oschmann, R. Rudolph and T. Scheibel, *Biochemistry*, 2004, **43**, 13604–13612.
- 17 D. Huemmerich, U. Slotta and T. Scheibel, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.*, 2006, **82**, 219–222.
- 18 X. Hu, D. Kaplan and P. Cebe, *Macromolecules*, 2006, **39**, 6161–6170.
- 19 K. Gast, A. Siemer, D. Zirwer and G. Damaschun, *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.*, 2001, **30**, 273–283.
- 20 A. Vasconcelos, G. Freddi and A. Cavaco-Paulo, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 1299–1305.
- 21 S. B. Darling, *Prog. Polym. Sci.*, 2007, **32**, 1152–1204.
- 22 S. Rammensee, U. Slotta, T. Scheibel and A. R. Bausch, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 6590–6595.
- 23 K. D. Hermanson, D. Huemmerich, T. Scheibel and A. R. Bausch, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 1810.
- 24 O. Rathore and D. Y. Sogah, *Macromolecules*, 2001, **34**, 2394.
- 25 J. Cao, M. L. Qi, Y. Zhang, S. Zhou, Q. L. Shao and R. N. Fu, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **561**, 88–95.
- 26 R. Gebhardt, C. Vendrely, M. Burghammer and C. Riekel, *Langmuir*, 2009, **25**, 6307–6311.
- 27 X. Hu, Q. Lu, D. L. Kaplan and P. Cebe, *Macromolecules*, 2009, **42**, 2079–2087.
- 28 M. Heim, L. Romer and T. Scheibel, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 156–164.
- 29 T. Arai, G. Freddi, R. Innocenti and M. Tsukada, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2004, **91**, 2383–2390.
- 30 J. H. Exler, D. Huemmerich and T. Scheibel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 3559–3562.
- 31 A. Leal-Egana and T. Scheibel, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2010, **55**, 155–167.
- 32 S. Wohlrab, S. Muller, A. Schmidt, S. Neubauer, H. Kessler, A. Leal-Egana and T. Scheibel, *Biomaterials*, 2012, **33**, 6650–6659.



## TEILARBEIT IV

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bereits in *Biotechnology of Silk* veröffentlicht als:

"The Power of Recombinant Spider Silk Proteins."

Wohlrab, S., Thamm, C., und Scheibel, T.

Reproduziert aus *Biotechnology of Silk* **2014**, 5, 179-2 mit freundlicher Genehmigung des  
Verlages Springer Science und Business Media.

# The power of recombinant spider silk proteins

Stefanie Wohlrab, Christopher Thamm, and Thomas Scheibel\*

Department of Biomaterials, University of Bayreuth  
Universitätsstr. 30  
95440 Bayreuth, Germany  
Phone: +49(0)921 55 7361  
Fax: +49(0)921 55 7346  
E-mail: [Thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de](mailto:Thomas.scheibel@bm.uni-bayreuth.de)

\* corresponding author

**Abstract** Due to their outstanding mechanical properties, their biocompatibility and biodegradability spider silk fibers are of high interest for researchers. Silk fibers mainly comprise proteins, and in the past decades biotechnological methods have been developed to produce spider silk proteins recombinantly in varying hosts, which will be summarized in this review. Further, several processing techniques like biomimetic spinning, wet-spinning or electro-spinning applied to produce fibers and non-woven meshes will be highlighted. Finally, an overview on recent developments concerning genetic engineering and chemical modification of recombinant silk proteins will be given, outlining the potential provided by recombinant spider silk-chimeric proteins and spider silk-inspired polymers (combining synthetic polymers and spider silk peptides).

**Keywords:** recombinant spider silk proteins, fibers, genetic engineering, chemical modification, biopolymer

## 1. Introduction

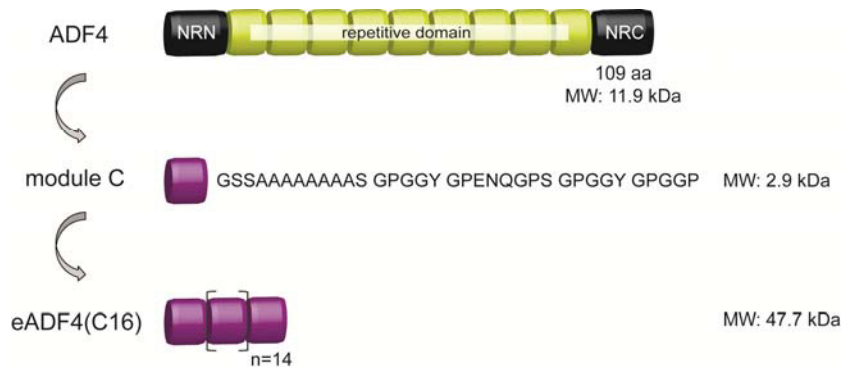
Female orb weaving spiders such as *Nephila clavipes* and *Araneus diadematus* are able to produce up to seven different silk types for different applications, such as catching and wrapping prey, for protecting their offspring etc. Spider silks are mainly made of silk proteins (spidroins) and they are named after the glands the proteins are produced in. The best characterized silk is the Major Ampullate (MA) silk (also known as dragline silk). In order to analyze the properties of spider silk as well as to use them in distinct applications, sufficient quantities of the material are necessary.

Unfortunately, due to their cannibalistic behavior it is not possible to farm spiders. Further, collecting silk from individual spiders is time consuming and not very effective. Therefore, silk genes have been transferred from spiders to other host organisms to produce recombinant spider silk proteins. Besides employing cDNA, engineered silk genes have been utilized encoding proteins which are comparable to the natural ones concerning toughness and elasticity.

Here, we summarize efforts to recombinantly produce spider silk proteins in bacteria and highlight the possibilities of their application-driven modification, as well as the techniques of processing them into fibers.

## 2. Recombinant production of Dragline silk proteins

Dragline silk comprises spidroins produced in the major ampullate gland and is used e.g. as the frame and the radii of an orb web, and also as the spider's lifeline. In comparison to most man-made fibers like Kevlar or carbon fibers, dragline silk has superior mechanical properties especially concerning its toughness (Heim et al. 2009; Gosline et al. 1999). Two major ampullate spidroin classes can be defined named MaSp 1 and MaSp 2, which mainly differ in proline content (MaSp1 shows no proline residues, while MaSp2 is enriched in proline residues). Furthermore, MaSp1 tends to be more hydrophobic than MaSp2. The molecular setup of MaSp proteins is given in figure 1 showing exemplary the MaSp2 protein ADF4 of *Araneus diadematus*.



**Figure 1:** Molecular setup of the recombinant protein eADF4 (C16) (engineered ADF4). A consensus repeat motif (Module C) is derived from the repetitive core of the dragline protein ADF4. By reverse translation, synthetic oligonucleotides can be produced and seamlessly cloned

Major ampullate spidroin monomers have a molecular weight of up to 350 kDa (Ayoub et al. 2007; Sponner et al. 2004). Despite of their different functions, spidroins comprise a highly repetitive core sequence, flanked by non-repetitive termini (Scheibel 2004; Eisoldt et al. 2011). The core domain accounts for approximately 90 % of the protein's sequence and consists of repeating motifs, each formed by 30-150 amino acids which can be repeated up to 100 times in a single spidroin (Hayashi et al. 2004; Guerette et al. 1996).

While the repetitive core domain of a spider silk protein is important for its macromolecular properties, the non-repetitive termini play a key-role in storage and assembly. Compared to the core domain, the carboxy (NRC)- and aminoterminal (NRN) domains are highly conserved for each silk type throughout different species or sometimes even between different silk types (Motriuk-Smith et al. 2005; Rising et al. 2006; Garb et al. 2010), indicating their highly important function. Both terminal domains of MaSp form five-helix bundles (Hagn et al. 2010; Askarieh et al. 2010; Hagn et al. 2011). The recently studied NRN domains of *Latrodectus hesperus* and *Euprostenops australis* are monomeric at pH above 6.8 and dimerize in an antiparallel fashion upon slight acidification. In comparison to the aminoterminal domains, the NRC domain of *Araneus diadematus* is a disulphide-linked, parallel dimer with one of the five helices being domain swapped. Importantly, all solution structures were solved using recombinantly produced proteins.

First attempts to produce recombinant spider silk proteins by using cDNA from spiders revealed several problems. Bacterial hosts such as *E. coli* have a different codon usage than spiders lowering the protein yield. Further repetitive sequences are often removed in bacteria by homologous recombination creating a polydisperse set of proteins with different molecular weight (Xu and Lewis 1990; Arcidiacono et al. 1998). Likewise, the efforts to express silk genes in eukaryotic cells were not successful or yielded low protein amounts (Menassa

et al. 2004; Lazaris et al. 2002). A short overview on different host organisms used for recombinant spider silk protein production is shown in table 1.

**Table 1:** Host organisms used for expressing spider cDNA and cDNA fragments

Host Organism	DNA Origin	MW [kDa] of the protein	Silk Type	References
<b>Procaryotes</b>				
<i>E. coli</i>	<i>N. clavipes</i>	43	MaSp1	(Arcidiacono et al. 1998)
<i>E. coli</i>	<i>N. clavipes</i>	12	MaSp1 & MaSp2	(Sponner et al. 2005)
<i>E. coli</i>	<i>N. antipodiana</i>	12-15	TuSp1	(Lin et al. 2009)
<i>E. coli</i>	<i>E. australis</i>	10-28	MaSp1	(Askarieh et al. 2010; Hedhammar et al. 2008; Stark et al. 2007)
<i>E. coli</i>	<i>L. hesperus</i>	N/A	PySp2	(Geurts et al. 2010)
<i>E. coli</i>	<i>L. hesperus</i>	33, 45	TuSp1	(Gnesa et al. 2012)
<b>Eukaryotes</b>				
Insect cells ( <i>S. fruiperda</i> )	<i>A. diadematus</i>	35-56	ADF3 & ADF4	(Huemmerich et al. 2004b)
Insect cells ( <i>S. fruiperda</i> )	<i>A. diadematus</i>	50-105	ADF3 & ADF4	(Ittah et al. 2006)
Insect cells ( <i>S. fruiperda</i> )	<i>A. ventricosus</i>	28	Flag	(Lee et al. 2007)
Insect cells ( <i>S. fruiperda</i> )	<i>A. ventricosus</i>	61	Polyhedron-Flag fusion protein	(Lee et al. 2007)
Mammalian cells (MAC-T & BHK)	<i>N. clavipes</i>	12	MaSp1 & MaSp2	(Lazaris et al. 2002)
Mammalian cells (MAC-T & BHK)	<i>A. diadematus</i>	60-140	ADF3	(Lazaris et al. 2002)
Mammalian cells (COS-1)	<i>Euprosthénops</i> sp.	22, 25	MaSp1	(Grip et al. 2006)
Transgenic animals (goats)	<i>A. diadematus</i>	60	ADF3	(Karatzas et al. 1999)
Transgenic animals (mice)	<i>N. clavipes</i>	31-66	MaSp1 & MaSp2	(Xu et al. 2007)
Transgenic animals ( <i>B. mori</i> )	<i>N. clavipes</i>	83	MaSp1	(Wen et al. 2010)
Yeast ( <i>P. pastoris</i> )	<i>N. clavipes</i>	33-39	MaSp1 & MaSp2	(Teulé et al. 2003)
Yeast ( <i>P. pastoris</i> )	<i>N. clavipes</i>	57-61	ADF3	(Teulé et al. 2003)

MaSp: major ampullate spidroin; ADF: *Araneus diadematus* fibroin; MAC-T: bovine mammary alveolar cells; BHK: baby hamster kidney cells; COS: fibroblast-like cell line derived from monkey kidney tissue; Flag: flagelliform; TuSp: tubiliform spidroin; PySp: pyriform spidroin; MW: molecular weight.

A more promising approach is the recombinant production of engineered spider silk spidroins with adapted DNA sequences. Based on the repetitive core sequence of spider silk spidroins, it is easy to design optimized genes by simple cloning techniques (Lawrence et al. 2004; Colgin and Lewis 1998; Hueimmerich et al. 2004a; Lewis et al. 1996; Prince et al. 1995; Vendrely et al. 2008). An overview on recent attempts is shown in table 2.

**Table 2:** Engineered spider silk proteins produced in different bacterial hosts

Silk Type	Origin	Size [kDa]	Host Organism	References
MaSp1	<i>L. hesperus</i>	N/A	<i>S. typhimurium</i>	(Widmaier et al. 2009; Widmaier and Voigt 2010)
	<i>N. clavipes</i>	100-285	<i>E. coli</i>	(Xia et al. 2010)
	<i>N. clavipes</i>	15-26	<i>E. coli</i>	(Winkler et al. 1999; Szela et al. 2000)
	<i>N. clavipes</i>	45-60	<i>E. coli</i>	(Huang et al. 2007; Wong Po Foo et al. 2006; Bini et al. 2006)
	<i>N. clavipes</i>	10-20	<i>E. coli</i>	(Fukushima 1998)
MaSp2	<i>A. aurantia</i>	63-71	<i>E. coli</i>	(Brooks et al. 2008b; Teulé et al. 2009)
	N/A	31-112	<i>E. coli</i>	(Lewis et al. 1996)
MaSp2/Flag	<i>N. clavipes</i>	58, 62	<i>E. coli</i>	(Teulé et al. 2007)
MaSp1 & MaSp2	<i>L. hesperus</i>	14	<i>E. coli</i>	(Hagn et al. 2011)
	<i>N. clavipes</i>	20-56	<i>E. coli</i>	(Arcidiacono et al. 2002; Mello et al. 2004)
	<i>N. clavipes</i>	N/A	<i>B. subtilis</i>	(Fahnestock 1994)
	<i>N. clavipes</i>	55, 67	<i>E. coli</i>	(Brooks et al. 2008a)
	<i>N. clavipes</i>	15-41	<i>E. coli</i>	(Prince et al. 1995)
	<i>N. clavipes</i>	65-163	<i>E. coli</i>	(Fahnestock and Irwin 1997)
ADF3, ADF4	<i>A. diadematus</i>	34-106	<i>E. coli</i>	(Schmidt et al. 2007; Hueimmerich et al. 2004a)
ADF1-ADF4	<i>A. diadematus</i>	25-56	<i>S. typhimurium</i>	(Widmaier et al. 2009; Widmaier and Voigt 2010)
Flag	<i>N. clavipes</i>	N/A	<i>S. typhimurium</i>	(Widmaier et al. 2009; Widmaier and Voigt 2010)
	<i>N. clavipes</i>	14-94	<i>E. coli</i>	(Heim et al. 2010; Vendrely et al. 2008)
	<i>N. clavipes</i>	25	<i>E. coli</i>	(Zhou et al. 2001)

### 3. Processing of recombinant spider silk proteins

Spider silk proteins can be processed into fibers, capsules, particles, hydrogels, foams, films or non-woven meshes (Schacht and Scheibel 2011; Spiess et al. 2010; Leal-Egana et al. 2012; Hardy et al. 2008). Assembly of the recombinant spidroins can be triggered by protein concentration, pH, temperature, ionic strength or mechanical stress, among others.

Here we will focus on processing of recombinant spider silk proteins into fibers and non-woven meshes.

#### 3.1. *Fibers*

In principle, several techniques can be applied to produce fibers from solutions of recombinant spider silk proteins. Here a short overview on recent attempts of two prominent techniques, namely wet spinning and biomimetic spinning will be given.

##### Wet spinning:

In wet spinning processes, polymer or protein solutions are extruded into a coagulation bath. The proteins, dissolved in aqueous solution or organic solvents are extruded into water, methanol, isopropanol or acetone (Seidel et al. 1998; Hardy et al. 2008). An overview on approaches to wet-spin recombinant spider silk proteins as well as mechanical properties of the achieved fibers are given in table 3.

The majority of the recombinant fibers have been made of MaSp1 and MaSp2 derivatives from *Nephila clavipes*. The molecular weight of the underlying proteins varied from 31 to 284 kDa with some tendency, but no strict relation between the molecular weight and tensile strength. Evidently, both the tensile strength and elasticity differed between fibers made of different recombinant spider silk proteins for reasons of molecular weight, but also protein sequence, concentration of the spinning solution, fiber diameter and the coagulation bath. There are also large deviations in the mechanical properties of the different fibers investigated in individual spinning approaches, as seen in table 3. Such variability makes it hardly possible to exactly predict the fiber's properties before spinning based on the amino acid sequence and/or the molecular weight. In principle the tensile strength of a fiber rises with decreasing diameter (Teulé et al. 2011) and increasing molecular weight of the protein (Xia et al. 2010), reaching a plateau above a specific protein size. Importantly, if compared to the mechanical properties of natural spider silk fibers, all man-made fibers show less mechanical stability, independent of the fiber diameter (Seidel et al. 2000).



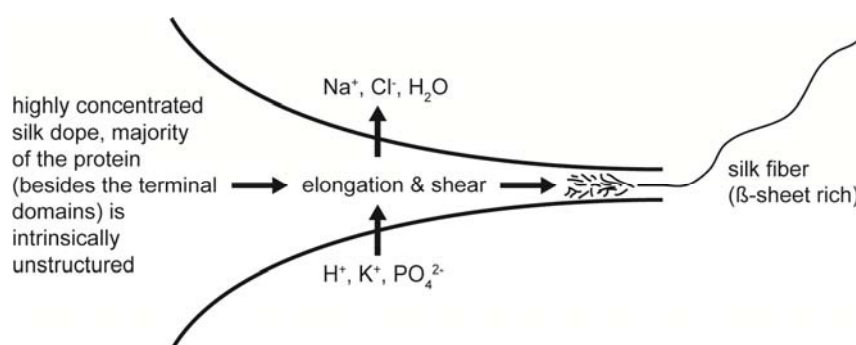
The reason for this finding could be related to molecular self-assembly of the spidroins. Therefore, a detailed analysis of this assembly is necessary, which is one basis of biomimetical spinning setups.

**Table 3:** Wet spun fibers from recombinant spider silk protein

Silk Types	Origin	MW [kDa] of the protein	Mechanical Properties		References
			Tensile strength [MPa]	Elasticity [%]	
Flag, MaSp like fusion proteins	<i>N. clavipes</i>	58	28.6 $\pm$ 17.2	3.7 $\pm$ 1.2	(Teulé et al. 2007)
		62	10.2 $\pm$ 7.3	1.6 $\pm$ 1.0	(Teulé et al. 2007)
MaSp1, Ma Spidroin 1+2	<i>N. clavipes</i>	43, 55	---	---	(Arcidiacono et al. 2002)
MaSp2	<i>A. aurantia</i>	63	6.6 $\pm$ 5.1	1.5 $\pm$ 0.3	(Brooks et al. 2008b)
		67	1.9 $\pm$ 2.4	19.0 $\pm$ 2.2	(Brooks et al. 2008b)
		71	49.5 $\pm$ 7.8	3.6 $\pm$ 2.6	(Brooks et al. 2008b)
ADF3	<i>A. diadematus</i>	60-140	---	43.4 – 59.6	(Lazaris et al. 2002)
MaSp1, MaSp2	<i>N. clavipes</i>	59-106	---	---	(Lazaris et al. 2002)
MaSp2	<i>N. clavipes</i>	31-112	---	---	(Lewis et al. 1996)
Ma Spidroin 1 analogs	<i>N. clavipes</i>	94	100.0 – 150.0	5.0 – 15.0	(Bogush et al. 2009)
Ma Spidroin 2 analogs	<i>N. madagascariensis</i>	113	100.0 – 150.0	5.0 – 15.0	(Bogush et al. 2009)
Ma Spidron 1 like fusion proteins	<i>N. clavipes</i>	64-126	---	---	(Yang et al. 2005)
MaSp1	<i>N. clavipes</i>	100-284	508.0 $\pm$ 108.0	15.0 $\pm$ 5.0	(Xia et al. 2010)
MaSp1	<i>N. clavipes</i>	46	16.3 $\pm$ 6.7	1.5 $\pm$ 0.4	(An et al. 2011)
		70	35.7 $\pm$ 8.4	3.1 $\pm$ 1.8	(An et al. 2011)
MaSp2, Flag	<i>N. clavipes</i>	58	28.4 $\pm$ 25.4	1.7 $\pm$ 0.6	(Teulé et al. 2011)
MaSp1, MaSp2 inspired protein	<i>N. clavipes</i>	50	280.0 – 350.0	27.0 – 42.0	(Elices et al. 2011)

### Biomimetic spinning:

Biomimetic spinning implements all factors that are important in the natural spinning process including molecular self-assembly of the spidroins. The main factors needed for a transition of a soluble state of the spidroins in the spinning dope into a solid fiber during natural spinning are a change in pH, ion exchange and internal water removal. In addition to chemical processes, extensional and shear forces in the duct are necessary to solidify the fiber (figure 2). Under storage conditions at pH 7, spidroins form micellar-like structures with liquid-crystalline properties to prevent aggregation (Knight and Vollrath 1999; Hu et al. 2007), whereby the terminal domains play a key role (Askarieh et al. 2010; Exler et al. 2007). Along the spinning duct the pH drops from around 7.4 to 6 and shear forces increase. Studies showed, that recombinant spidroins with NRC domains assemble into fibers while recombinant proteins without NRC domains only unspecifically aggregate (Hagn et al. 2010; Eisoldt et al. 2010; Rammensee et al. 2008). Further, the NRC domain has been shown to be important for pre-orientation of the core domains structure (Askarieh et al. 2010; Exler et al. 2007; Eisoldt et al. 2010).



**Figure 2:** Schematic overview of the parameters critical for the natural spinning process of spider dragline silk. During this process, the pH is acidified and phosphate and potassium ions are pumped into the silk dope, while water and chloride are extracted from the dope. Mechanical stress induces the formation of a silk fiber with high  $\beta$ -sheet content

Such knowledge has been used to develop microfluidic devices mimicking the geometry of silk glands, and which allowed controlling the chemical and mechanical parameters necessary to produce silk fibers.

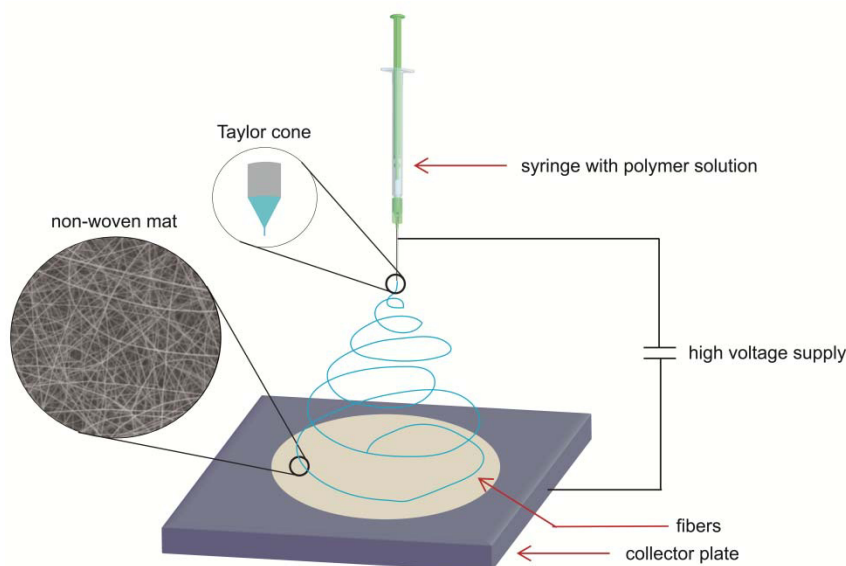
Rammensee et al. presented a microfluidic device which allowed to assemble recombinant spidroins in aqueous solution using solely the natural triggers (Rammensee et al. 2008). Next generation microfluidic devices allowed to produce functional spider silk fibers with predictable width (Kinahan et al. 2011).

The fiber diameter can be controlled by the flow rate of the protein solution within the microfluidic channel. The velocity along the silk gland of spiders rises due to a steady decrease in radius (Breslauer et al. 2009). Different spinning speeds have also a significant effect on the properties of the resulting fibers (Vollrath et al. 2001), likely because of higher molecular alignment caused by stretching of the fiber. *In vitro*, higher flow rates than in natural processes are needed based on less concentrated protein solutions in comparison to nature where increased concentration and thereby viscosity leads to fiber formation at lower elongation flow rates (Rammensee et al. 2008). Although microfluidic devices provide a simple method to produce uniformly sized fibers, there are still problems to produce endless and consistent fibers with properties similar to that of the natural blueprint.

### ***3.2. Non-woven meshes made of recombinant spider silk proteins***

Electrospinning of biopolymers is a cost effective and easy way to produce non-woven meshes with high inter-fiber spacing and fiber diameters ranging from micrometers down to a few nanometers (Frenot and Chronakis 2003). The advantage of electrospinning is the low amount of polymer solution needed to generate continuous fibers (Baumgarten 1971). If an electric field is applied to a pendant droplet of polymer solution a Taylor cone is formed, and a polymer jet is created, which directs towards the counter electrode. The solvent evaporates before reaching the collector plate, and dried fibers can be collected e.g. as a non-woven mat (Huang et al. 2003). The fiber diameter can be controlled by the viscosity, the concentration of the polymer solution, the salt content, the surface tension of the solvent, the distance to the counter electrode, as well as the polymer itself (molecular weight, molecular weight distribution, solubility, and glass transition temperature) (Heikkilä and Harlin 2008; Greiner and Wendorff 2007). Furthermore, the surrounding temperature and the relative humidity can significantly influence fiber formation (figure 3).

To guarantee the continuity of the fibers, the concentration of the silk solution must be high enough to permit the entanglement between the silk molecules. Interaction between the solvent and the silk molecules, as well as their molecular weight, will influence the minimal concentration needed (Chengjie et al. 2009). Depending on the collector set up, single fibers or non-woven meshes can be achieved, the later showing a high surface area to volume ratio and a high potential for applications in e.g. tissue engineering and wound healing.



**Figure 3:** Scheme of an electrospinning setup. An electric field is applied to a pendant droplet of polymer solution leading to a Taylor cone, from which a polymer jet emerges. The solvent evaporates before reaching the collector plate, and dried fibers can be collected e.g. as a non-woven mat (Huang et al. 2003)

Several groups have electrospun different silk types, including regenerated *B. mori* silk, regenerated *N. clavipes* dragline silk and silk-like polymers from organic solvents like formic acid (FA), Hexafluoroisopropanol (HFIP) or Hexafluoroacetone (HFA) (Buchko et al. 1999; Jin et al. 2002; Zarkoob et al. 2004). Only a few electrospinning setups employed recombinant spider silk proteins as depicted below.

The recombinant spider silk protein eADF4(C16) (based on the dragline silk of *A. diadematus*) was dissolved in HFIP at concentrations from 4 % (w/v) to 24 % (w/v). Below 8% (w/v) nanoparticles were obtained (akin to electro-spraying), while homogeneous fibers could only be produced at concentrations above 16 % (w/v). With increasing protein concentration the fibers diameter increased from 150 nm to 700 nm (Leal-Egana et al. 2012). All as-spun eADF4(C16) fibers from HFIP were water soluble and predominantly consisted of random coil and  $\alpha$ -helical structures. Since in most applications water stable fibers are necessary, the non-woven meshes can be post-treated with methanol vapor to induce the formation of  $\beta$ -sheet structures (Leal-Egana et al. 2012). Another way to promote  $\beta$ -sheet formation in non-woven meshes is temperature or humidity annealing (Wang et al. 2006; Zarkoob et al. 2004).

Cell culture experiments with BALB/3T3 mouse fibroblasts on post-treated eADF4(C16) non-woven meshes showed that cell adhesion and proliferation were strictly dependent on the diameter of the individual fibers. With

increasing fiber diameters cells adhere much better to the meshes, and their doubling time decreases while their proliferation rate increases. One explanation for this phenomena is that the bigger the fiber diameter, the bigger the spacing between the fibers, making it easier for lammellipodia and filopodia to protrude (Leal-Egana et al. 2012).

Bini *et al.* created two engineered proteins based on the consensus sequence derived from MaSp 1 of *Nephila calvipes*. One of the proteins was further fused with an RGD motif to enhance cell interactions. Non-woven meshes comprising these proteins were spun from HFIP solutions, and the obtained fiber diameters ranged from 50 to 250 nm with an average diameter of 100 nm. To increase the  $\beta$ -sheet content non-woven meshes were post-treated with methanol (Bini et al. 2006) (cf. Chapter 4.1).

To generate organic-inorganic composite non-woven scaffolds, an R5 peptide (derived from the repetitive motif of silaffin proteins) was fused to *N. clavipes* spider dragline silk protein, either in presence or absence of an additional RGD motif (Foo et al. 2006). Fibers of the chimeric spider silk-silaffin proteins were spun from HFIP. Incubation of these non-woven meshes with silicic acid solution induced silica sphere formation on the non-woven mats with diameters ranging from 200 to 400 nm. Since the non-woven meshes were not post-treated, the fibers fused upon incubation in silicic acid. Contrarily, when non-woven meshes were treated with methanol before silification, silica nanospheres were sparsely observed. Silification reactions during electrospinning (concurrent processing) resulted in a non-uniform coating of the fibers but no particle formation (Foo et al. 2006).

## 4. Modification of recombinant silk proteins

One advantage of recombinant spider silk proteins is the ease of genetic modification which allows the direct incorporation of functional groups into the silk proteins (as already depicted in some examples in 3.) Alternatively, chemical modification of distinct naturally occurring or artificially introduced specific amino acid side chains is feasible.

### 4.1. Genetic engineering

Genetic engineering of silk genes allows to incorporate either individual amino acids, or even peptide sequences that enable enhanced cell adhesion or

improved solubility (table 4). In the following, several attempts to modify silk proteins for specific applications are summarized.

**Table 4:** Chimeric spider silk proteins for diverse biomedical applications

Fusion protein	Application	References
Silk + silicifying peptides	Scaffolds for bone regeneration	Foo <i>et al.</i> , 2006 Mieszawska <i>et al.</i> , 2010 Belton <i>et al.</i> , 2012
Silk + dentin matrix protein	Scaffolds for bone regeneration	Huang <i>et al.</i> , 2007
Silk + RGD peptides	Biomedical applications	Bini <i>et al.</i> , 2006 Morgan <i>et al.</i> , 2008 Wohlrab <i>et al.</i> , 2012
Silk + poly(L-lysine)	Drug delivery	Numata <i>et al.</i> , 2009 Numata <i>et al.</i> , 2012
Silk + poly(L-lysine) + cell penetrating peptide	Drug delivery	Numata and Kaplan 2010
Silk + antimicrobial domain	Tissue engineering	Currie <i>et al.</i> , 2011 Gomes <i>et al.</i> 2011

#### Biom mineralisation:

Biosilica architectures in diatoms are produced under ambient conditions (aqueous solution, neutral pH and low temperatures). *In vitro*, the R5 peptide (derived from the repetitive motif of the silaffin protein of *Cylindrotheca fusiformis*) regulates and induces silica formation under similar conditions. To generate scaffolds for bone regeneration, the R5 sequence was genetically fused to an RGD containing *N. clavipes* spider dragline silk protein (as mentioned in 3.) (Foo *et al.* 2006). Besides fibers, the resulting chimeric silk-silica protein was processed into films. By treating such films with silicic acid solution, the R5 peptide induces biomineralization on the surface (Foo *et al.* 2006). Osteogenic differentiation was analyzed culturing human mesenchymal stem cells (hMSCs) on such silk-silica protein films. The bound silica influenced osteogenic gene expression with upregulation of alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), and collagen type 1 (Col 1). Calcium deposits on silk-silica films further indicated enhanced osteogenesis (Mieszawska *et al.* 2010).

Belton *et al.* determined the silica condensation using a range of silicifying peptides (R5: SSKKSGSYSGSKGSKRRIL; A1: SGSKGSKRRIL; Si4-1: MSPHPHPRHHHT, and repeats thereof) fused to the N-terminus of a recombinant *N. clavipes* spider dragline silk protein. The authors determined a strict relationship between silk solution properties (e.g. pH of the solution) and silica deposition, leading to silica silk chimera material formation (Belton *et al.* 2012).

Another approach for using silk scaffolds in bone formation was investigated by Huang *et al.*, producing a chimeric protein based on the MaSp1 of *N. clavipes* and dentin matrix protein 1 which is involved in the nucleation

and crystallization of hydroxyapatite. The recombinantly produced protein was processed into films, which showed no structural differences in comparison to films of non-modified silk. Incubation of processed films in simulated body fluids induced the growth of hydroxyapatite crystals on silk films with the fused dentin matrix protein 1, indicating their potential for applications in bone tissue engineering. (Huang et al. 2007).

#### Cell adhesion:

For biomedical applications the interaction of a material's surface with cells or tissue is highly important. One strategy to improve cell adhesion is to change the surface topography of a material (Leal-Egana et al. 2012; Leal-Egana and Scheibel 2012). Another one is modification of the silk proteins with cell adhesive peptides. The recombinant spider silk protein eADF4(C16) was genetically modified with the linear cell adhesion sequence GRGDSPG. The RGD-modified protein was successfully processed into films, and cell adhesion and proliferation of mouse fibroblasts (BALB 3T3) was investigated thereon. In comparison to unmodified spider silk films, cells on RGD-modified films showed improved adhesion and proliferation (Wohlrab et al. 2012).

Bini *et al.* combined the consensus sequence derived from MaSp1 of *N. clavipes* with the cell binding motif RGD. The modified silk was processed into films and fibers, which were successfully used for culturing human bone marrow stromal cells (hMSCs). In comparison to the tissue culture plastic, silk surfaces showed increased calcium deposition, but surprisingly no impact on cell differentiation was observed (Bini et al. 2006). Since cell binding is dependent on the surface density of RGD, Morgan *et al.* blended RGD modified recombinant spidroin with *B. mori* silk in different ratios (10:90, 30:70, 50:50, 70:30, 90:10 RGD-spidroin : silk fibroin) to adjust the RGD concentration exposed on the silk film surface. Strikingly, the proliferation and differentiation of pre-osteoblasts (MC3T3-E1) was indistinguishable between the various blends. (Morgan et al. 2008).

#### Gene delivery:

Engineered block copolymers of spider silk with poly(L-lysine) domains were investigated as gene delivery systems. The silk-poly(L-lysine) copolymer self-assembles into complexes with plasmid DNA (pDNA) through electrostatic interactions. The resulting particles delivered genes into human embryonic kidney cells (HEK) (Numata et al. 2009). To increase the delivery efficiency, incorporation of cell penetrating peptides (CPPs), like ppTG1, into silk hybrids was investigated. CPPs which are known to be amphipathic and positively charged (Zorko and Langel 2005) are able to deliver large-cargo molecules into cells (Madani et al. 2011). Complexes of the silk-poly(L-lysine)-ppTG1 protein with pDNA showed a transfection efficiency comparable to the transfection reagent Lipofectamine 2000 (Numata and Kaplan 2010). In another study the tumor-homing peptide (THP) was fused to a silk-poly(L-lysine) block copolymer. The pDNA complex of silk-poly(L-lysine)-THP block copolymers showed a significantly enhanced targeting of specific tumor cells (Numata et al. 2011; Numata et al. 2012).



#### Antimicrobial silk:

Silver containing silk materials could be used in applications in which antimicrobial activity is needed. Therefore, Currie *et al.* fused a silver binding peptide to a recombinant spider dragline silk protein derived from MaSp1 of *N. clavipes*. The resulting protein nucleated Ag ions from a silver nitrate solution (Currie *et al.* 2011). Regarding antimicrobial activity, Gomes *et al.* fused the consensus sequence derived from the MaSp1 of *N. clavipes* with three different antimicrobial peptides (the human antimicrobial peptides human neutrophil defensin 2 (HNP-2), human neutrophil defensin 4 (HNP-4) and hepcidin). The recombinantly produced chimeric proteins were processed into films, and it was demonstrated that the silk domain retained its self-assembly properties. The antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* was analyzed, and the microbial activity was demonstrated. Furthermore, cell studies with a human osteosarcoma cell line (SaOs-2) demonstrated the compatibility of these films with mammalian cells (Gomes *et al.* 2011).

#### Others:

To control the solubility of spider silk proteins Winkler *et al.* incorporated methionine residues next to polyalanine sequences, found in the dragline silk of *N. clavipes*, to trigger  $\beta$ -sheet formation. This methionine residues can work as redox triggers (Winkler *et al.* 1999). The oxidation to the sulfoxide state with phenacyl bromide yields a water-soluble protein and prevents the formation of  $\beta$ -sheets by disrupting the hydrophobic interactions between the overlaying sheets. Reduction with  $\beta$ -mercaptoethanol, in contrast, triggers self-assembly into  $\beta$ -sheets, without disturbing the general macromolecular assembly behavior (Valluzzi *et al.* 1999; Szela *et al.* 2000).

To control the  $\beta$ -sheet content, enzymatic phosphorylation and dephosphorylation reactions were performed with genetically engineered spider dragline silk proteins. By introducing charged phosphate groups using cyclic AMP-dependent protein kinase, hydrophobic interactions between the  $\beta$ -sheets were prevented, and thus solubility of the proteins increased. Concomitantly, dephosphorylation with calf intestinal alkaline phosphatase induced self-assembly and  $\beta$ -sheet formation (Winkler *et al.* 2000).

In addition to functional peptide sequences, individual amino acid residues with chemically specific side chains (such as thiols of cysteine residues) can be incorporated in engineered spider silk proteins. Due to the fact that thiol side chains of cysteines are ideally suited for modifications at neutral pH, a single cysteine was introduced in eADF4(C16) (Spiess *et al.* 2010). In comparison to the cysteine free variant, no differences concerning protein structure or assembly were detectable in solution and in the films. It could be shown that target molecules like maleimide-conjugated fluorescein were successfully coupled to the cysteine-modified silk proteins in processed films as well as in solution.

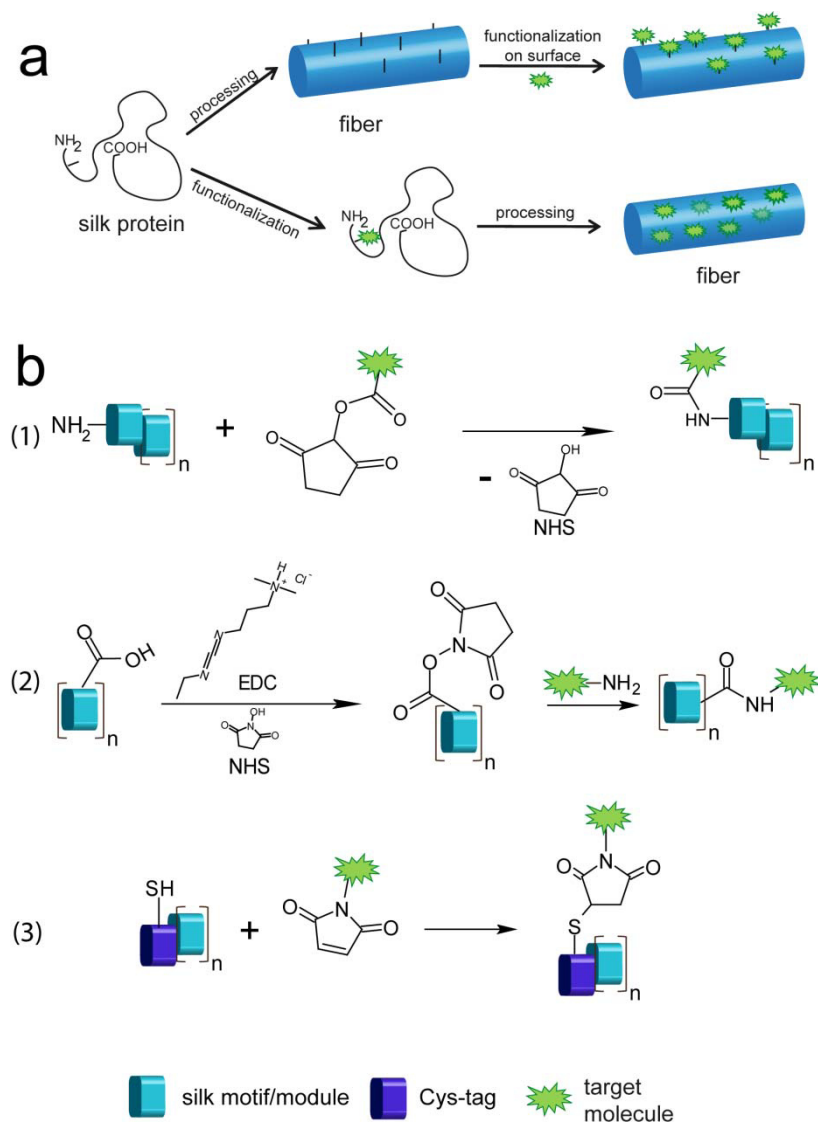
## 4.2. Chemical functionalization

Chemical modification of silk proteins is an alternative route towards the functionalization of silk materials. Due to the fact that most chemical reactions occur in the presence of other functional groups, there must be a high selectivity thereof. Further, the coupling should in the best case take place at physiological conditions (Sletten and Bertozzi 2009). The functionalization of silk proteins is often much easier than that of globular proteins, since silk proteins are mostly intrinsically unfolded in aqueous solution. Typically, modifications of amino acid side chains are achieved by modifications using electrophilic or nucleophilic groups (Carrico 2008). Most recombinantly produced spidroins comprise non-reactive glycine and alanine residues and lack amino acids residues with functional groups like lysines or cysteines. Nevertheless glutamic acid, aspartic acid as well as tyrosine residues allow specific chemical modifications of spidroins (Vendrey and Scheibel 2007).

Modification of recombinant spider silk proteins is possible in solution and after processing into different morphologies (Figure 4a). For example small organic molecules as well as biological macromolecules like enzymes can be immobilized on eADF4(C16) films by modification of glutamatic acid residues. After activation of the carboxyl groups (one per repetitive unit in addition to the C-terminus) with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide (EDC/NHS), the enzyme  $\beta$ -galactosidase was efficiently coupled (Huemmerich et al. 2006). The activity of the enzyme after coupling was demonstrated using the specific substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal). Empolying an ethylenediamine linker after EDC/NHS activation allowed coupling of fluorescein-5-isothiocyanat (FITC) to the eADF4(C16) film's surface.

To create a single chemical bond between the recombinant spider silk protein eADF4(C16) and a target, one way is the modification of the N-terminus (since eADF4(C16) does not contain any other primary amines) (Schacht and Scheibel 2011). The one-step reaction of N-hydroxysuccinimide (NHS)-activated carboxylic acid targets with primary amines is, however, limited by a low specificity (Thordarson et al. 2006). Due to the fact that thiol side chains of cysteine residues are ideally suited for modifications at neutral pH, a single cysteine residue was introduced in eADF4(C16) (Spiess et al. 2010) (Figure 4b, see also 4.2). Thiol modification was performed using maleimide, which reacts selectively and quantitatively in a single step procedure with thiol groups forming a stable thioether bond (Partis et al. 1983; Heitz et al. 1968). It has been shown that after eADF4(C16) film formation, target molecules like maleimide-conjugated fluorescein, monomaleimido-nanogold particles and  $\beta$ -galactosidase (in combination with NHS-PEO<sub>12</sub>-Maleimide crosslinker) could be successfully coupled (Spiess et al. 2010). Since there are no side-reactive complications, like in the case of carbodiimide

activation (glutamic acid residues), the reaction was further used to couple a maleimide modified cyclic RGD peptide (Wohlrab et al. 2012).



**Figure 4:** Chemical modification of engineered spider silk proteins; (a) Two routes of functionalization of silk fibers can be achieved: processing of the fibers followed by chemical modification or chemical functionalization in aqueous solution followed by fiber production; (b) Modification of recombinant silk proteins with N-hydroxysuccinimide (NHS)-activated carboxylic acid targets at primary amines (1) or functionalization of terminal carboxyl groups and glutamic acid residues with EDC/NHS activation followed by functionalization with different primary amines (2) (Huemmerich et al. 2006) or at thiol groups in cysteine modified variants through maleimide chemistry (3) (Spiess et al. 2010; Humenik et al. 2011; Schacht and Scheibel 2011)

### 4.3. Silk-polymer hybrids

Silk peptides can be combined with synthetic polymers like poly(ethylene glycol) (PEG) or poly(isoprene) to achieve new functionalities (Zhou et al. 2006; Rathore and Sogah 2001). Rathore and Sogah designed a *N.clavipes*-inspired block-copolymer by selective replacement of the amorphous peptide domain with flexible non-peptidic poly(ethylene glycol) (PEG) blocks, while retaining the poly(alanine) sequences (Rathore and Sogah 2001). The silk-polymer hybrids were synthesized with varying chain length of the poly(alanine) blocks via prefabricated blocks which were linked block by block (Lego method) (Winningham and Sogah 1997; Rathore and Sogah 2001). Despite the replacement, the silk peptide blocks achieved  $\beta$ -sheet conformation in the resulting polymer. Next, the mechanical properties of silk-polymer films and fibers were determined. Compared with films made of a *B. mori*-inspired block copolymer, the spider silk-inspired analogue films were tougher and stronger. Furthermore, increasing the length of the poly(alanine) block resulted in increased elastic modulus and tensile strength. As a result of the higher stiffness, the elongation at break decreased with increasing length of the poly(alanine) block (Rathore and Sogah 2001).

Since oligo- and polythiophenes are an interesting class of (semi)conducting materials, Klok *et al.* established the synthesis of diblock oligomers with oligo(3-alkylthiophene) (HT-O3AT) and the silk inspired pentapeptide (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly) via solid phase acylation of the resin-bound pentapeptide for electronic applications. In addition to  $\beta$ -alkylated oligothiophenes which usually form organized lamellar assemblies, silk peptide conjugate assembly is driven by directed hydrogen bonding interactions (Klok et al. 2004).

In one approach a low-molecular-weight gelator (LMWGs) based on the silk-like tetrapeptide Gly-Ala-Gly-Ala was designed. To introduce additional van der Waals interactions and to regulate the solubility, apolar alkyl tails ( $C_{12}$ ) were added as terminal groups (Escuder and Miravet 2006). Gels with a  $\beta$ -sheet fibril network were obtained in several organic solvents like tetrahydrofuran, chloroform, cyclohexane or toluene. The fibrils (less than 20 nm) assembled into a network of bundles with a length of several micrometers and a width of  $\sim 100$  nm (Escuder and Miravet 2006). By varying the alkyl chain length (from  $C_3$  to  $C_{12}$ ) or by adding aromatic groups (phenyl or 4-nitrophenyl), the gelation behavior in different polar and apolar solvents could be controlled. For example, only compounds with similar alkyl chains on both ends formed gels in acetone, whereas compounds with dissimilar alkyl chains were not able to form gels (Iqbal et al. 2008).

## 5. Outlook

Spider silks are known for their outstanding mechanical properties and their biocompatibility since ages. Over the last decades, scientists developed several approaches to produce spider silk proteins recombinantly. Although major improvements have been made, certain questions still remain, concerning assembly, solubility and storage of spider silk proteins. Nevertheless, the possibility to process spider silk proteins into various morphologies together with the ability to produce different spider silk chimera and spider silk inspired polymers will allow various applications in medical and technical fields.

**Acknowledgements** This work was supported by DFG SCHE 603/4-4. The authors would like to thank Gregor Lang, Claudia Blüm and Aniela Heidebrecht for providing images and data.

## Literature

- An B, Hinman MB, Holland GP, Yarger JL, Lewis RV (2011) Inducing beta-sheets formation in synthetic spider silk fibers by aqueous post-spin stretching. *Biomacromolecules* 12 (6):2375-2381. doi:10.1021/bm200463e
- Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, Bayley H (1998) Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49 (1):31-38. doi:10.1007/s002530051133
- Arcidiacono S, Mello CM, Butler M, Welsh E, Soares JW, Allen A, Ziegler D, Laue T, Chase S (2002) Aqueous processing and fiber spinning of recombinant spider silks. *Macromolecules* 35 (4):1262-1266. doi:10.1021/ma011471o
- Askarieh G, Hedhammar M, Nordling K, Saenz A, Casals C, Rising A, Johansson J, Knight SD (2010) Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature* 465 (7295):236-238. doi:10.1038/nature08962
- Ayoub NA, Garb JE, Tinghitella RM, Collin MA, Hayashi CY (2007) Blueprint for a high-performance biomaterial: Full-length spider dragline silk genes. *Plos One* 2 (6):e514. doi:10.1371/journal.pone.0000514
- Baumgarten PK (1971) Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J Colloid Interface Sci* 36 (1):71-79. doi:10.1016/0021-9797(71)90241-4

- Belton DJ, Mieszawska AJ, Currie HA, Kaplan DL, Perry CC (2012) Silk-silica composites from genetically engineered chimeric proteins: Materials properties correlate with silica condensation rate and colloidal stability of the proteins in aqueous solution. *Langmuir* 28 (9):4373-4381. doi:10.1021/La205084z
- Bini E, Foo CW, Huang J, Karageorgiou V, Kitchel B, Kaplan DL (2006) RGD-functionalized bioengineered spider dragline silk biomaterial. *Biomacromolecules* 7 (11):3139-3145. doi:10.1021/bm0607877
- Bogush VG, Sokolova OS, Davydova LI, Klinov DV, Sidoruk KV, Esipova NG, Neretina TV, Orchanskyi IA, Makeev VY, Tumanyan VG, Shaitan KV, Debabov VG, Kirpichnikov MP (2009) A novel model system for design of biomaterials based on recombinant analogs of spider silk proteins. *J Neuroimmune Pharmacol* 4 (1):17-27. doi:10.1007/s11481-008-9129-z
- Breslauer DN, Lee LP, Muller SJ (2009) Simulation of flow in the silk gland. *Biomacromolecules* 10 (1):49-57. doi:10.1021/Bm800752x
- Brooks AE, Nelson SR, Jones JA, Koenig C, Hinman M, Stricker S, Lewis RV (2008a) Distinct contributions of model MaSp1 and MaSp2 like peptides to the mechanical properties of synthetic major ampullate silk fibers as revealed in silico. *Nanotechnol Sci Appl* 1:9-16. doi:10.2147/NSA.S3961
- Brooks AE, Stricker SM, Joshi SB, Kamerzell TJ, Middaugh CR, Lewis RV (2008b) Properties of synthetic spider silk fibers based on *Argiope aurantia* MaSp2. *Biomacromolecules* 9 (6):1506-1510. doi:10.1021/bm701124p
- Buchko CJ, Chen LC, Shen Y, Martin DC (1999) Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer* 40 (26):7397-7407. doi:10.1016/S0032-3861(98)00866-0
- Carrico IS (2008) Chemoselective modification of proteins: hitting the target. *Chem Soc Rev* 37 (7):1423-1431. doi:10.1039/B703364h
- Chengjie F, Zhengzhong S, Vollrath F (2009) Animal silks: their structures, properties and artificial production. *Chem Commun* (43):6515-6529. doi:10.1039/B911049F
- Colgin MA, Lewis RV (1998) Spider minor ampullate silk proteins contain new repetitive sequences and highly conserved non-silk-like "spacer regions". *Protein Sci* 7 (3):667-672. doi:10.1002/pro.5560070315
- Currie HA, Deschaume O, Naik RR, Perry CC, Kaplan DL (2011) Genetically engineered chimeric silk-silver binding proteins. *Adv Funct Mater* 21 (15):2889-2895. doi:10.1002/adfm.201100249
- Eisoldt L, Hardy JG, Heim M, Scheibel TR (2010) The role of salt and shear on the storage and assembly of spider silk proteins. *J Struct Biol* 170 (2):413-419. doi:10.1016/j.jsb.2009.12.027
- Eisoldt L, Scheibel T, Smith A (2011) Decoding the secrets of spider silk. *Mater Today* 14 (3):80-86. doi:10.1016/S1369-7021(11)70057-8

- Elices M, Guinea GV, Plaza GR, Karatzas C, Riekel C, Agulló-Rueda F, Daza R, Pérez-Rigueiro J (2011) Bioinspired fibers follow the track of natural spider silk. *Macromolecules* 44 (5):1166-1176. doi:10.1021/ma102291m
- Escuder B, Miravet JF (2006) Silk-inspired low-molecular-weight organogelator. *Langmuir* 22 (18):7793-7797. doi:10.1021/La060499w
- Exler JH, Hummerich D, Scheibel T (2007) The amphiphilic properties of spider silks are important for spinning. *Angew Chem Int Ed* 46 (19):3559-3562. doi:10.1002/anie.200604718
- Fahnestock S (1994) Novel, recombinantly produced spider silk analogs. USA Patent WO 94/29450, 22.12.1994
- Fahnestock SR, Irwin SL (1997) Synthetic spider dragline silk proteins and their production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 47 (1):23-32. doi:10.1007/s002530050883
- Foo CWP, Patwardhan SV, Belton DJ, Kitchel B, Anastasiades D, Huang J, Naik RR, Perry CC, Kaplan DL (2006) Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *PNAS* 103 (25):9428-9433. doi:10.1073/pnas.0601096103
- Frenot A, Chronakis IS (2003) Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 8 (1):64-75. doi:10.1016/S1359-0294(03)00004-9
- Fukushima Y (1998) Genetically engineered syntheses of tandem repetitive polypeptides consisting of glycine-rich sequence of spider dragline silk. *Biopolymers* 45 (4):269-279. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(19980405)4
- Garb JE, Ayoub NA, Hayashi CY (2010) Untangling spider silk evolution with spidroin terminal domains. *BMC Evol Biol* 10:243. doi:10.1186/1471-2148-10-243
- Geurts P, Zhao L, Hsia Y, Gnesa E, Tang S, Jeffery F, Mattina CL, Franz A, Vierra C (2010) Synthetic spider silk fibers spun from pyriform spidroin 2, a glue silk protein discovered in orb-weaving spider attachment discs. *Biomacromolecules* 11 (12):3495-3503. doi:10.1021/bm101002w
- Gnesa E, Hsia Y, Yarger JL, Weber W, Lin-Cereghino J, Lin-Cereghino G, Tang S, Agari K, Vierra C (2012) Conserved C-terminal domain of spider tubuliform spidroin 1 contributes to extensibility in synthetic fibers. *Biomacromolecules* 13 (2):304-312. doi:10.1021/bm201262n
- Gomes SC, Leonor IB, Mano JF, Reis RL, Kaplan DL (2011) Antimicrobial functionalized genetically engineered spider silk. *Biomaterials* 32 (18):4255-4266. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.040
- Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS, Savage KN (1999) The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol* 202 (23):3295-3303



- Greiner A, Wendorff JH (2007) Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angew Chem Int Ed* 46 (30):5670-5703. doi:10.1002/anie.200604646
- Grip S, Rising A, Nimmervoll H, Storckenfeldt E, McQueen-Mason SJ, Pouchkina-Stantcheva N, Vollrath F, Engström W, Fernandez-Arias A (2006) Transient expression of a major ampullate spidroin 1 gene fragment from *Euprosthonops* sp. in mammalian cells. *Cancer Genomics - Proteomics* 3 (2):83-87
- Guerette PA, Ginzinger DG, Weber BHF, Gosline JM (1996) Silk properties determined by gland-specific expression of a spider fibroin gene family. *Science* 272 (5258):112-115. doi:10.1126/science.272.5258.112
- Hagn F, Eisoldt L, Hardy JG, Vendrely C, Coles M, Scheibel T, Kessler H (2010) A highly conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* 465 (7295):239-242. doi:10.1038/nature08936
- Hagn F, Thamm C, Scheibel T, Kessler H (2011) pH-dependent dimerization and salt-dependent stabilization of the N-terminal domain of spider dragline silk--implications for fiber formation. *Angew Chem Int Ed* 50 (1):310-313. doi:10.1002/anie.201003795
- Hardy JG, Romer LM, Scheibel TR (2008) Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer* 49 (20):4309-4327. doi:10.1016/j.polymer.2008.08.006
- Hayashi CY, Blackledge TA, Lewis RV (2004) Molecular and mechanical characterization of aciniform silk: Uniformity of iterated sequence modules in a novel member of the spider silk fibroin gene family. *Mol Biol Evol* 21 (10):1950-1959. doi:10.1093/molbev/msh204
- Hedhammar M, Rising A, Grip S, Martinez AS, Nordling K, Casals C, Stark M, Johansson J (2008) Structural properties of recombinant nonrepetitive and repetitive parts of major ampullate spidroin 1 from *Euprosthonops australis*: implications for fiber formation. *Biochemistry* 47 (11):3407-3417. doi:10.1021/bi702432y
- Heikkilä P, Harlin A (2008) Parameter study of electrospinning of polyamide-6. *Eur Polym J* 44 (10):3067-3079. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.06.032
- Heim M, Ackerschott CB, Scheibel T (2010) Characterization of recombinantly produced spider flagelliform silk domains. *J Struct Biol* 170 (2):420-425. doi:10.1016/j.jsb.2009.12.025
- Heim M, Keerl D, Scheibel T (2009) Spider silk: From soluble protein to extraordinary fiber. *Angew Chem Int Ed* 48 (20):3584-3596. doi:10.1002/anie.200803341
- Heitz JR, Anderson CD, Anderson BM (1968) Inactivation of yeast alcohol dehydrogenase by N-alkylmaleimides. *Arch Biochem Biophys* 127 (1-3):627-636. doi:10.1016/0003-9861(68)90271-3

- Hu XY, Yuan J, Wang XD, Vasanthavada K, Falick AM, Jones PR, La Mattina C, Vierra CA (2007) Analysis of aqueous glue coating proteins on the silk fibers of the cob weaver, *Latrodectus hesperus*. *Biochemistry* 46 (11):3294-3303. doi:10.1021/bi602507e
- Huang J, Wong C, George A, Kaplan DL (2007) The effect of genetically engineered spider silk-dentin matrix protein 1 chimeric protein on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials* 28 (14):2358-2367. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.021
- Huang ZM, Zhang YZ, Kotaki M, Ramakrishna S (2003) A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol* 63 (15):2223-2253. doi:10.1016/S0266-3538(03)00178-7
- Huemmerich D, Helsen CW, Quedzuweit S, Oschmann J, Rudolph R, Scheibel T (2004a) Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* 43 (42):13604-13612. doi:10.1021/Bi048983q
- Huemmerich D, Scheibel T, Vollrath F, Cohen S, Gat U, Ittah S (2004b) Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Curr Biol* 14 (22):2070-2074. doi:10.1016/j.cub.2004.11.005
- Huemmerich D, Slotta U, Scheibel T (2006) Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Appl Phys A: Mater Sci Process* 82 (2):219-222. doi:10.1007/s00339-005-3428-5
- Humenik M, Smith AM, Scheibel T (2011) Recombinant spider silks—Biopolymers with potential for future applications. *Polymers* 3 (1):640-661. doi:10.3390/polym3010640
- Iqbal S, Miravet JF, Escuder B (2008) Biomimetic self-assembly of tetrapeptides into fibrillar networks and organogels. *Eur J Org Chem* (27):4580-4590. doi:10.1002/ejoc.200800547
- Ittah S, Cohen S, Garty S, Cohn D, Gat U (2006) An essential role for the C-terminal domain of a dragline spider silk protein in directing fiber formation. *Biomacromolecules* 7 (6):1790-1795. doi:10.1021/bm060120k
- Jin HJ, Fridrikh SV, Rutledge GC, Kaplan DL (2002) Electrospinning *Bombyx mori* silk with poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules* 3 (6):1233-1239. doi:10.1021/Bm025581u
- Karatzas CN, Turner JD, Karatzas A-L (1999) Production of Biofilaments in Transgenic Animals. Canada Patent WO 99/47661,
- Kinahan ME, Filippidi E, Koster S, Hu X, Evans HM, Pfohl T, Kaplan DL, Wong J (2011) Tunable silk: Using microfluidics to fabricate silk fibers with controllable properties. *Biomacromolecules* 12 (5):1504-1511. doi:10.1021/bm1014624
- Klok HA, Rosler A, Gotz G, Mena-Osteritz E, Bauerle P (2004) Synthesis of a silk-inspired peptide oligothiophene conjugate. *Org Biomol Chem* 2 (24):3541-3544. doi:10.1039/B415454a

- Knight DP, Vollrath F (1999) Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proc Biol Sci* 266 (1418):519-523. doi:10.1098/rspb.1999.0667
- Lawrence BA, Vierra CA, Moore AMF (2004) Molecular and mechanical properties of major ampullate silk of the black widow spider, *Latrodectus hesperus*. *Biomacromolecules* 5 (3):689-695. doi:10.1021/Bm0342640
- Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y, Zhou JF, Duguay F, Chretien N, Welsh EA, Soares JW, Karatzas CN (2002) Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* 295 (5554):472-476. doi:10.1126/science.1065780
- Leal-Egana A, Lang G, Mauere C, Wickinghoff J, Weber M, Geimer S, Scheibel T (2012) Interactions of fibroblasts with different morphologies made of an engineered spider silk protein. *Adv Eng Mater* 14 (3):B67-B75. doi:10.1002/adem.201180072
- Leal-Egana A, Scheibel T (2012) Interactions of cells with silk surfaces. *J Mater Chem* 22 (29):14330-14336. doi:10.1039/C2jm31174g
- Lee KS, Kim BY, Je YH, Woo SD, Sohn HD, Jin BR (2007) Molecular cloning and expression of the C-terminus of spider flagelliform silk protein from *Araneus ventricosus*. *J Biosci* 32 (4):705-712. doi:10.1007/s12038-007-0070-8
- Lewis RV, Hinman M, Kothakota S, Fournier MJ (1996) Expression and purification of a spider silk protein: A new strategy for producing repetitive proteins. *Protein Express Purif* 7 (4):400-406. doi:10.1006/prep.1996.0060
- Lin Z, Huang W, Zhang J, Fan JS, Yang D (2009) Solution structure of eggcase silk protein and its implications for silk fiber formation. *PNAS* 106 (22):8906-8911. doi:10.1073/pnas.0813255106
- Madani F, Lindberg S, Langel U, Futaki S, Graslund A (2011) Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J Biophys* 2011:10 pages. doi:10.1155/2011/414729
- Mello CM, Soares JW, Arcidiacono S, Butlers MM (2004) Acid extraction and purification of recombinant spider silk proteins. *Biomacromolecules* 5 (5):1849-1852. doi:10.1021/Bm049815g
- Menassa R, Hong Z, Karatzas CN, Lazaris A, Richman A, Brandle J (2004) Spider dragline silk proteins in transgenic tobacco leaves: accumulation and field production. *Plant Biotechnol J* 2 (5):431-438. doi:10.1111/j.1467-7652.2004.00087.x
- Mieszawska AJ, Nadkarni LD, Perry CC, Kaplan DL (2010) Nanoscale control of silica particle formation via silk-silica fusion proteins for bone regeneration. *Chem Mater* 22 (20):5780-5785. doi:10.1021/Cm101940u
- Morgan AW, Roskov KE, Lin-Gibson S, Kaplan DL, Becker ML, Simon CG, Jr. (2008) Characterization and optimization of RGD-containing silk

- blends to support osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 29 (16):2556-2563. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.02.007
- Motriuk-Smith D, Smith A, Hayashi CY, Lewis RV (2005) Analysis of the conserved N-terminal domains in major ampullate spider silk proteins. *Biomacromolecules* 6 (6):3152-3159. doi:10.1021/bm050472b
- Numata K, Kaplan DL (2010) Silk-based gene carriers with cell membrane destabilizing peptides. *Biomacromolecules* 11 (11):3189-3195. doi:10.1021/Bm101055m
- Numata K, Mieszawska-Czajkowska AJ, Kvenvold LA, Kaplan DL (2012) Silk-based nanocomplexes with tumor-homing peptides for tumor-specific gene delivery. *Macromol Biosci* 12 (1):75-82. doi:10.1002/mabi.201100274
- Numata K, Reagan MR, Goldstein RH, Rosenblatt M, Kaplan DL (2011) Spider silk-based gene carriers for tumor cell-specific delivery. *Bioconjugate Chem* 22 (8):1605-1610. doi:10.1021/bc200170u
- Numata K, Subramanian B, Currie HA, Kaplan DL (2009) Bioengineered silk protein-based gene delivery systems. *Biomaterials* 30 (29):5775-5784. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.06.028
- Partis MD, Griffiths DG, Roberts GC, Beechey RB (1983) Cross-linking of protein by omega-maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. *J Protein Chem* 2 (3):263-277. doi:10.1007/BF01025358
- Prince JT, Mcgrath KP, Digirolamo CM, Kaplan DL (1995) Construction, cloning, and expression of synthetic genes encoding spider dragline silk. *Biochemistry* 34 (34):10879-10885. doi:10.1021/bi00034a022
- Rammensee S, Slotta U, Scheibel T, Bausch AR (2008) Assembly mechanism of recombinant spider silk proteins. *PNAS* 105 (18):6590-6595. doi:10.1073/pnas.0709246105
- Rathore O, Sogah DY (2001) Self-assembly of beta-sheets into nanostructures by poly(alanine) segments incorporated in multiblock copolymers inspired by spider silk. *J Am Chem Soc* 123 (22):5231-5239. doi:10.1021/Ja004030d
- Rising A, Hjalms G, Engstrom W, Johansson J (2006) N-terminal nonrepetitive domain common to dragline, flagelliform, and cylindriiform spider silk proteins. *Biomacromolecules* 7 (11):3120-3124. doi:10.1021/bm060693x
- Schacht K, Scheibel T (2011) Controlled hydrogel formation of a recombinant spider silk protein. *Biomacromolecules* 12 (7):2488-2495. doi:10.1021/Bm200154k
- Scheibel T (2004) Spider silks: recombinant synthesis, assembly, spinning, and engineering of synthetic proteins. *Microb Cell Fact* 3 (1):14. doi:10.1186/1475-2859-3-14
- Schmidt M, Romer L, Strehle M, Scheibel T (2007) Conquering isoleucine auxotrophy of *Escherichia coli* BLR(DE3) to recombinantly produce spider silk proteins in minimal media. *Biotechnol Lett* 29 (11):1741-1744. doi:10.1007/s10529-007-9461-z

- Seidel A, Liivak O, Calve S, Adaska J, Ji GD, Yang ZT, Grubb D, Zax DB, Jelinski LW (2000) Regenerated spider silk: Processing, properties, and structure. *Macromolecules* 33 (3):775-780. doi:10.1021/ma990893j
- Seidel A, Liivak O, Jelinski LW (1998) Artificial spinning of spider silk. *Macromolecules* 31 (19):6733-6736. doi:10.1021/ma9808880
- Sletten EM, Bertozzi CR (2009) Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angew Chem Int Ed* 48 (38):6974-6998. doi:10.1002/anie.200900942
- Spiess K, Wohlrab S, Scheibel T (2010) Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* 6 (17):4168-4174. doi:10.1039/B927267d
- Sponner A, Unger E, Grosse F, Weisshart K (2004) Conserved C-termini of spidroins are secreted by the major ampullate glands and retained in the silk thread. *Biomacromolecules* 5 (3):840-845. doi:10.1021/bm034378b
- Sponner A, Vater W, Rommerskirch W, Vollrath F, Unger E, Grosse F, Weisshart K (2005) The conserved C-termini contribute to the properties of spider silk fibroins. *Biochem Biophys Res Commun* 338 (2):897-902. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.048
- Stark M, Grip S, Rising A, Hedhammar M, Engstrom W, Hjalmar G, Johansson J (2007) Macroscopic fibers self-assembled from recombinant miniature spider silk proteins. *Biomacromolecules* 8 (5):1695-1701. doi:10.1021/Bm070049y
- Szela S, Avtges P, Valluzzi R, Winkler S, Wilson D, Kirschner D, Kaplan DL (2000) Reduction-oxidation control of beta-sheet assembly in genetically engineered silk. *Biomacromolecules* 1 (4):534-542. doi:10.1021/Bm0055697
- Teulé F, Addison B, Cooper AR, Ayon J, Henning RW, Benmore CJ, Holland GP, Yarger JL, Lewis RV (2011) Combining flagelliform and dragline spider silk motifs to produce tunable synthetic biopolymer fibers. *Biopolymers* 97 (6):418-431. doi:10.1002/bip.21724
- Teulé F, Aubé C, Ellison M, Abbott A (2003) Biomimetic manufacturing of customised novel fibre proteins for specialised applications. *AUTEX Res J* 3 (4):160-165
- Teulé F, Cooper AR, Furin WA, Bittencourt D, Rech EL, Brooks A, Lewis RV (2009) A protocol for the production of recombinant spider silk-like proteins for artificial fiber spinning. *Nat Protoc* 4 (3):341-355. doi:10.1038/nprot.2008.250
- Teulé F, Furin WA, Cooper AR, Duncan JR, Lewis RV (2007) Modifications of spider silk sequences in an attempt to control the mechanical properties of the synthetic fibers. *J Mater Sci* 42 (21):8974-8985. doi:10.1007/s10853-007-1642-6

- Thordarson P, Le Droumaguet B, Velonia K (2006) Well-defined protein-polymer conjugates-synthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 73 (2):243-254. doi:10.1007/s00253-006-0574-4
- Valluzzi R, Szela S, Avtges P, Kirschner D, Kaplan D (1999) Methionine redox controlled crystallization of biosynthetic silk spidroin. *J Phys Chem B* 103 (51):11382-11392. doi:10.1021/jp991363s
- Vendrely C, Ackerschott C, Roemer L, Scheibel T (2008) Molecular design of performance proteins with repetitive sequences: Recombinant flagelliform spider silk as basis for biomaterials. *Methods Mol Biol* 474:3-14. doi:10.1007/978-1-59745-480-3\_1
- Vendrely C, Scheibel T (2007) Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol Biosci* 7 (4):401-409. doi:10.1002/mabi.200600255
- Vollrath F, Madsen B, Shao ZZ (2001) The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268 (1483):2339-2346. doi:10.1098/rspb.2001.1590
- Wang M, Yu JH, Kaplan DL, Rutledge GC (2006) Production of submicron diameter silk fibers under benign processing conditions by two-fluid electrospinning. *Macromolecules* 39 (3):1102-1107. doi:10.1021/Ma0517749
- Wen HX, Lan XQ, Zhang YS, Zhao TF, Wang YJ, Kajiura Z, Nakagaki M (2010) Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol Biol Rep* 37 (4):1815-1821. doi:10.1007/s11033-009-9615-2
- Widmaier DM, Tullman-Ercek D, Mirsky EA, Hill R, Govindarajan S, Minshull J, Voigt CA (2009) Engineering the *Salmonella* type III secretion system to export spider silk monomers. *Mol Syst Biol* 5:309. doi:10.1038/msb.2009.62
- Widmaier DM, Voigt CA (2010) Quantification of the physiochemical constraints on the export of spider silk proteins by *Salmonella* type III secretion. *Microb Cell Fact* 9:78. doi:10.1186/1475-2859-9-78
- Winkler S, Szela S, Avtges P, Valluzzi R, Kirschner DA, Kaplan D (1999) Designing recombinant spider silk proteins to control assembly. *Int J Biol Macromol* 24 (2-3):265-270. doi:10.1016/S0141-8130(98)00088-9
- Winkler S, Wilson D, Kaplan DL (2000) Controlling beta-sheet assembly in genetically engineered silk by enzymatic phosphorylation/dephosphorylation. *Biochemistry* 39 (41):12739-12746. doi:10.1021/Bi001335w
- Winningham MJ, Sogah DY (1997) A modular approach to polymer architecture control via catenation of prefabricated biomolecular segments: Polymers containing parallel beta-sheets templated by a phenoxathiin-based reverse turn mimic. *Macromolecules* 30 (4):862-876. doi:10.1021/ma960804s

- Wohlrab S, Mueller S, Schmidt A, Neubauer S, Kessler H, Leal-Egana A, Scheibel T (2012) Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* 33 (28):6650-6659. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.069
- Wong Po Foo C, Patwardhan SV, Belton DJ, Kitchel B, Anastasiades D, Huang J, Naik RR, Perry CC, Kaplan DL (2006) Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103 (25):9428-9433. doi:10.1073/pnas.0601096103
- Xia XX, Ki CS, Park YH, Kaplan DL, Lee SY (2010) Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered *Escherichia coli* results in a strong fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 107 (32):14059-14063. doi:10.1073/pnas.1003366107
- Xu HT, Fan BL, Yu SY, Huang YH, Zhao ZH, Lian ZX, Dai YP, Wang LL, Liu ZL, Fei J, Li N (2007) Construct synthetic gene encoding artificial spider dragline silk protein and its expression in milk of transgenic mice. *Anim Biotechnol* 18 (1):1-12. doi:10.1080/10495390601091024
- Xu M, Lewis RV (1990) Structure of a protein superfiber - Spider dragline silk. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87 (18):7120-7124. doi:10.1073/pnas.87.18.7120
- Yang JJ, Barr LA, Fahnestock SR, Liu ZB (2005) High yield recombinant silk-like protein production in transgenic plants through protein targeting. *Transgenic Res* 14 (3):313-324. doi:10.1007/s11248-005-0272-5
- Zarkoob S, Eby RK, Reneker DH, Hudson SD, Ertley D, Adams WW (2004) Structure and morphology of electrospun silk nanofibers. *Polymer* 45 (11):3973-3977. doi:10.1016/j.polymer.2003.10.102
- Zhou CC, Leng BX, Yao JR, Qian J, Chen X, Zhou P, Knight DP, Shao ZZ (2006) Synthesis and characterization of multiblock copolymers based on spider dragline silk proteins. *Biomacromolecules* 7 (8):2415-2419. doi:10.1021/Bm060199t
- Zhou CZ, F. C, Jacquet M, Perasso R, Li ZG, Janin J (2001) Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence. *Proteins: Struct, Funct, Genet* 44 (2):119-122. doi:10.1002/prot.1078
- Zorko M, Langel U (2005) Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Delivery Rev* 57 (4):529-545. doi:10.1016/j.addr.2004.10.010

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und ohne die eine Fertigstellung nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Scheibel für die Möglichkeit bedanken, auf diesem interessanten, vielseitigen und spannenden Projekt promovieren zu dürfen. Durch seine Unterstützung und Vertrauen in den letzten Jahren, konnte ich meine Arbeit mit vielen Freiheiten anfertigen und dennoch jederzeit um Rat fragen.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Andreas Fery und Dr. Stefan Geimer für die Übernahme meines Mentorats.

Folgenden Kooperationspartnern möchte ich für die erfolgreiche und gute Zusammenarbeit danken:

- Prof. Dr. Horst Kessler und Stefanie Neubauer für die Synthese und Breitstellung des cyclischen RGD-Peptids
- Dr. Hendrik Bargel und Johannes Diehl für REM Aufnahmen
- Dr. Martin Humenik und Dr. Christopher Synatschke für die Vorbereitung und Durchführung der MALDI-TOF Analysen
- Markus Hund für die Einweisung und Hilfestellungen am AFM
- Andreas Schmidt für die Herstellung von C16SpRGE
- Dr. Aldo Leal für seine Unterstützung in der Zellkultur
- Martin Trebbin für die Erstellung des Siliziumwafers
- Aniela Heidebrecht für die CLSM Aufnahmen
- Dr. Kristina Spieß und Dr. Felix Bauer für die sehr angenehme Zusammenarbeit und die vielen Fachgespräche hinsichtlich der Veröffentlichungen
- Prof. Dr. Kaplan and Katie Martinick for the nice collaboration, even if the results are not part of this thesis



Jasmin, Dani, Anderl und Johannes danke ich für die vielen Tätigkeiten und Unterstützung im Laboralltag. Susanne Schramm möchte ich für den reibungslosen Ablauf aller organisatorischen Dinge, ihr immer offenes Ohr und ihre freundliche Art danken.

Danke an dieser Stelle auch an alle die diese Arbeit Korrektur gelesen haben!

Allen alten *Fibers* und neuen *BioMatlern* danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, für Tipps und Tricks im Laborleben, viele lustige Momente und für die netten Kaffee- und Kuchenpausen. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Bürokollegen Claudia, Martina, Kristin und Bruno für die konstruktive und freundschaftliche Bürogemeinschaft und die tolle Zeit. Ein besonderer Dank geht an Martin, der mit seinem fundiertem Fachwissen, wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Bei meiner Familie bedanke ich mich zutiefst für die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen. Meinem Sohn Jonas, der unendliche Geduld aufbrachte und oft auf mich verzichten musste, danke ich dafür, dass er es immer wieder schaffte, mir ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern.

## **(EIDESSTATTLICHE) VERSICHERUNGEN UND ERKLÄRUNGEN**

(§ 8 S. 2 Nr. 6 PromO)

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung hinsichtlich der eigenständigen Anfertigung der Dissertation unterzogen werden kann.

(§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO)

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

(§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO)

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

(§ 8 S. 2 Nr. 10 PromO)

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerbliche Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

.....

Ort, Datum, Unterschrift